

**LUANA MENEZHINI**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS AMNÉSICAS NA  
MEMÓRIA EMOCIONAL DE RATOS NO LCE.**

**Florianópolis – SC  
2006**

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

**LUANA MENEZHINI**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM DROGAS AMNÉSICAS NA  
MEMÓRIA EMOCIONAL DE RATOS NO LCE.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
curso de Pós-graduação em Neurociências  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

**Florianópolis – SC  
2006**

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across  
nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the  
"Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Moacir, por quem tenho enorme admiração e respeito, pela oportunidade, constante ajuda e orientação. Agradeço por seus ensinamentos científicos, éticos e profissionais que possibilitaram meu crescimento. Desejo muita felicidade em sua vida.

À querida amiga Márcia por ser uma grande companheira durante todo o mestrado, compartilhando os bons e maus momentos.

Aos bons amigos Marcos e Fábio por serem colaboradores deste estudo e parceiros em diversos momentos.

Às bolsistas de iniciação científica Rúbia e Fernanda pela grande ajuda neste trabalho.

À querida Rose por seu carinho e amizade.

Aos funcionários, em especial ao Carlos Hercílio Espíndola (Carlão) pelo bom dia e grande sorriso todas as manhãs, ao Nivaldo e à Ana Cláudia.

Aos colegas: Ana Paula Ruiz, Sara, Eduardo, Murilo, Sérgio, Patrícia, Isabel e Ana Paula Fraga que compartilharam de várias formas, diferentes momentos do mestrado.

Aos Professores Marta e Marino que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À minha maravilhosa família, por estar sempre ao meu lado me fortalecendo.

Às colegas de profissão Anna, Priscila e Andréa por serem verdadeiras amigas.

Em especial aos animais que contribuíram de forma involuntária com suas vidas para realização deste estudo em prol da pesquisa.

Ao meu amor Luiz por tudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABELAS .....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1. Memória .....	12
1.1.1. Potenciação de longa duração .....	13
1.1.2. Fases da memória .....	15
1.1.3. Memória emocional .....	15
1.2. Labirinto em cruz elevado .....	17
1.2.1. Validação do labirinto em cruz elevado .....	18
1.2.2. Estímulo ansiogênico no labirinto em cruz elevado .....	19
1.2.3. A origem da ansiedade no labirinto em cruz elevado .....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo Geral .....	23
2.2. Objetivos Específicos .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1. Animais.....	24
3.2. Drogas.....	24
3.3. Labirinto em cruz elevado .....	25
3.4. Procedimentos .....	26
3.4.1. Experimento 1: Aquisição de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado .....	26
3.4.2. Experimento 2: Consolidação de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado .....	27
3.4.3. Experimento 3: Evocação de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado .....	27
3.5. Coleta, transcrição e organização dos dados.....	28
3.6. Análise estatística .....	29

<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1. Aquisição de memória emocional no labirinto em cruz elevado .....	30
4.1.1. Resultados de aquisição considerando-se o tempo total de exposição .	30
4.1.2. Resultados de aquisição considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto (análise temporal).....	33
4.2. Consolidação de memória emocional no labirinto em cruz elevado.....	43
4.2.1. Resultados de consolidação considerando-se o tempo total de exposição .....	43
4.2.2. Resultados de consolidação considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto (análise temporal).....	47
4.3. Evocação de memória emocional no labirinto em cruz elevado.....	52
4.3.1. Resultados de evocação considerando-se o tempo total de exposição .	52
4.3.2. Resultados de evocação considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto (análise temporal).....	54
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Eventos moleculares envolvidos nas fases precoce e tardia da LTP.	14
Figura 2 - Amígdala basolateral na consolidação da memória emocional .....	16
Figura 3 - O Labirinto em Cruz Elevado .....	25
Figura 4 - Sala de experimentação e iluminação .....	26
Figura 5- Porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos, tratados com diferentes drogas e submetidos ao paradigma primeira exposição e segunda exposição do LCE.....	32
Figura 6- Análise temporal das porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como dos números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE- Escopolamina.....	35
Figura 7- Análise temporal da porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como dos números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE- Agmatina .....	37
Figura 8- Análise temporal da porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como das números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE- Clonidina .....	41

Figura 9- Análise temporal da porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como dos números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE- MK801.....42

Figura 10- Porcentagem de entrada (A), tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 0 ...  
.....44

Figura 11- Porcentagem de entrada (A), tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 30 .  
.....45

Figura 12- Porcentagem de entrada (A), tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 180  
.....46

Figura 13- Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 0 .....48

Figura 14- Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 30 .....50

Figura 15- Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao

Figura 16- Porcentagem de entrada (A), tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Evocação.....53

Figura 17- Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Evocação .....55



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aquisição de memória emocional no LCE. Resultados da ANOVA de duas vias da análise do tempo total (5 minutos) indicando os efeitos principais e interações.....31

Tabela 2- Aquisição de memória emocional no LCE. Resultados da ANOVA de três vias da análise minuto a minuto indicando os efeitos principais e interações .....33

Tabela 3- Consolidação de memória emocional no LCE. Resultados da ANOVA de duas vias da análise do tempo total (5 minutos) indicando os efeitos principais e interações..... 43

Tabela 4- Consolidação de memória emocional no LCE. Resultados da ANOVA de três vias da análise minuto a minuto indicando os efeitos principais e interações..... 47

Tabela 5- Evocação de memória emocional no LCE. Resultados da ANOVA de uma via da análise do tempo total (5 minutos) ..... 52

Tabela 6- Evocação de memória emocional no LCE. Resultados da ANOVA de duas vias da análise minuto a minuto indicando os efeitos principais e interações..... 54

## RESUMO

A literatura tem demonstrado que a experiência prévia de ratos no labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade, altera a exploração subsequente do mesmo, o que indica a ocorrência de um processo de aprendizagem ou memória emocional. O presente estudo avaliou o efeito do tratamento com drogas amnésicas nas diferentes fases da memória emocional de ratos no LCE. Para avaliar a aquisição de memória, ratos Wistar machos foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%), Escopolamina (ESC, antagonista muscarínico; 0.5, 1.0 e 4.0mg/kg), Clonidina (CLO, agonista  $\alpha_2$  adrenérgico; 0.05, 0.1 e 0.2mg/kg), Agmatina (AGM, inibidor da NOS; 20 e 40mg/kg) ou MK801(antagonista NMDA; 0.075 e 0.1mg/kg), e após 30 minutos, foram submetidos a duas exposições ao LCE, com duração de 5 minutos e intervalo de 24 horas. Para verificar a consolidação de memória, os animais foram tratados (via i.p.) imediatamente, 30 ou 180 minutos após a primeira exposição, com salina (0.9%), ESC (1.0mg/kg), AGM (40mg/kg), CLO (0.2mg/kg) ou MK801(0.1mg/kg). No dia seguinte, os animais foram re-expostos ao LCE. Para avaliar a evocação de memória, ratos foram submetidos ao LCE sem administração de droga e, no dia seguinte, receberam (via i.p.) salina (0.9%), ESC (1.0mg/kg), AGM (40mg/kg), CLO (0.2mg/kg) ou MK801(0.1mg/kg) 30 minutos antes da segunda exposição ao labirinto. A porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos (%EA e %TA) e número de entradas nos braços abertos e fechados (EA e EF) foram avaliados. Os dados foram analisados considerando-se o comportamento do animal no tempo total de cada exposição (análise do tempo total) e em cada minuto separadamente (análise temporal). Os resultados demonstraram que os grupos tratados com ESC (0.5, 1.0 e 4.0mg/kg), AGM (20mg/kg), CLO (0.05, 0.1 e 0.2mg/kg) exibiram prejuízo da aquisição de memória emocional, enquanto o tratamento com MK801 (0.075 e 0.1mg/kg) induziu efeito ansiolítico na primeira exposição ao LCE. Nenhum tratamento alterou a consolidação de memória, enquanto que os tratamentos com ESC (1.0mg/kg) e CLO (0.2mg/kg) prejudicaram a evocação de memória emocional no LCE. Nossos resultados indicam a participação dos receptores muscarínicos e  $\alpha_2$  adrenérgicos nas fases de aquisição e evocação de memória, bem como o possível envolvimento da síntese de NO na aquisição de memória emocional no LCE.

## ABSTRACT

It has been shown that prior experience of rats in the elevated plus maze (EPM), an animal model of anxiety, alters the subsequent maze exploration, thus indicating that an emotional learning or memory process occurs along maze exploration. The present study evaluated the effect of the amnesic drugs treatment in the different stages of emotional memory of the rats in the EPM. In order to evaluate the acquisition stage of memory, male wistar rats were treated (i.p. route) with either saline (0.9%), Scopolamine (SCP, muscarinic antagonist; 0.5, 1.0 e 4.0mg/kg), Clonidine (CLO,  $\alpha_2$  adrenergic agonist; 0.05, 0.1 e 0.2mg/kg), Agmatine (AGM, NOS inhibitor; 20 e 40mg/kg) ou MK801(NMDA antagonist; 0.075 e 0.1mg/kg), and after 30 minutes, were submitted to two EPM trials, with 5 minute length and 24hours interval. To evaluate the consolidation stage of memory, the animals were treated (i.p. route) immediately, 30 and 180 minutes after EPM trial<sub>1</sub>, with either saline (0.9%), SCP (1.0mg/kg), AGM (40mg/kg), CLO (0.2mg/kg) or MK801(0.1mg/kg). On the next day, the animals were submitted to EPM trial<sub>2</sub>. In order to evaluate the evocation stage of memory, rats were submitted to EPM trial<sub>1</sub> (drug free) and, on the next day, received (i.p. route) either saline (0.9%), SCP (1.0mg/kg), AGM (40mg/kg), CLO (0.2mg/kg) or MK801(0.1mg/kg) 30 minutes prior EPM trial<sub>2</sub>. The percentage of either entries or time spent in the open arms (%OE and %OT) and the number of entries into the open and enclosed arms (OE and EE) were evaluated. The data were analysed by considering the total time of the trial and by considering the animal behaviour over the time (temporal analysis). The data showed that the groups treated with SCP (0.5, 1.0 and 4.0mg/kg), AGM (20mg/kg), CLO (0.05, 0.1 and 0.2mg/kg) prior to the trial<sub>1</sub> exhibited impaired emotional memory acquisition, while the treatment with MK801 (0.075 e 0.1mg/kg) induced an anxiolytic effect in EPM trial<sub>1</sub>. The memory consolidation was not affected by any drug treatment, but the groups treated with SCP (1.0mg/kg) and CLO (0.2mg/kg) prior to the trial<sub>2</sub> exhibited impaired emotional memory evocation in the EPM. Our data indicates that muscarinic and  $\alpha_2$  adrenergic receptors may be important for the acquisition and evocation stages of memory, and that the NO synthesis may participate of the acquisition stage of emotional memory in the EPM.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Memória

Aprendizado pode ser definido como o mecanismo pelo qual novas informações ou conhecimentos são adquiridos, ou seja, é a aquisição de novas informações, sendo o primeiro estágio da memória. Já a memória é a retenção da informação aprendida (LYNCH, 2004), sendo um processo que requer a coordenação de diferentes regiões do encéfalo e sistemas neurotransmissores (HU et al., 2005).

A memória geralmente é categorizada em memória explícita e implícita. A memória explícita, ou declarativa, é a memória para fatos e eventos. Em humanos, é descrita como o recordar consciente de eventos passados (BEAR et al., 2002) e, em animais, como o processamento de informação contextual e espacial (RICHTER-LEVIN e AKIRAV, 2003). São memórias fáceis de serem formadas e esquecidas (SQUIRE e KANDEL, 2003). Estas memórias dependem da integridade do lobo temporal e estruturas diencefálicas como o hipocampo e córtex entorrinal (LYNCH, 2004).

A memória implícita, ou não declarativa, inclui formas associativas de memória, como o condicionamento clássico (relação entre dois estímulos), e formas não associativas, como a habituação e a sensibilização (exposição repetida a um único estímulo) e o aprendizado relacionado com o medo (aprendizado emocional) (SQUIRE et al., 1990). A retenção do conhecimento não declarativo é inconsciente e requer repetição e prática durante um certo período, mas são difíceis de serem esquecidos (SQUIRE e KANDEL, 2003). As memórias implícitas dependem da integridade do cerebelo, amígdala e outros sistemas (THOMPSON, 1996; BEAR et al., 2002).

De acordo com a duração da memória, esta pode ser dividida em memórias de curta duração, que duram de segundos a horas e são vulneráveis a perturbações (traumatismo craniano ou eletrochoque convulsivo) e memórias de longa duração, que persistem por muitos dias, meses ou anos após terem sido armazenadas (BEAR et al., 2002). A nível celular, o armazenamento da memória de longa duração é associado com expressão gênica, síntese de proteínas e novas conexões

sinápticas. Inibidores de síntese de proteínas podem bloquear a formação de memória de longa duração, mas não afeta a memória de curta duração (LYNCH, 2004).

### 1.1.1 Potenciação de longa duração

A potenciação de longa duração - LTP (do inglês, *Long Term Potentiation*) tem sido considerada um modelo celular para aprendizagem e memória, visto que os mecanismos celulares (despolarização da célula pós sináptica, ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos e de receptores NMDA e influxo de cálcio) para formação da LTP são também necessários para formação da memória. A LTP consiste de fases que envolvem diferentes mecanismos moleculares, sendo que uma fase é dita precoce, ou indução da LTP, enquanto a outra é chamada de fase tardia, ou de manutenção da LTP. A fase precoce da LTP dura cerca de duas a três horas e é independente da síntese de proteína, enquanto que a fase tardia dura muitas horas (*in vitro*) e semanas (*in vivo*) e requer a síntese de novas proteínas (BAILEY et al., 2000; LYNCH, 2004; McGAUGH, 2000).

A LTP ocorre em consequência da liberação de glutamato (GLU) pelos terminais axonais e ativação dos receptores pós-sinápticos do GLU do tipo AMPA e NMDA. Inicialmente somente os receptores do tipo AMPA são ativados pelo GLU, pois o íon magnésio bloqueia o canal do receptor do tipo NMDA. A indução da LTP ocorre pela ativação dos receptores AMPA pelo GLU, despolarizando o neurônio pós-sináptico e removendo o bloqueio do magnésio sobre o canal dos receptores NMDA. A ligação do GLU ao receptor NMDA, somada à remoção do bloqueio do magnésio sobre os receptores NMDA, leva ao influxo de cálcio no neurônio pós-sináptico e ativação de proteínas-quinase (PK), incluindo a do tipo cálcio-calmodulina dependente (CaMKII) e a do tipo C (PKC). A fase tardia da LTP ocorre quando a enzima adenil-ciclase é ativada pelo cálcio, ou através de receptores acoplados à proteína G, levando ao aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que ativa PK-dependente de AMPC, tal como a PK do tipo A (PKA). A PKA se transloca para o núcleo e leva a fosforilação de diversos fatores de

A LTP também tem sido demonstrada no cerebelo, no núcleo lateral da amígdala, que desempenha importante papel na memória emocional e no córtex pré frontal.

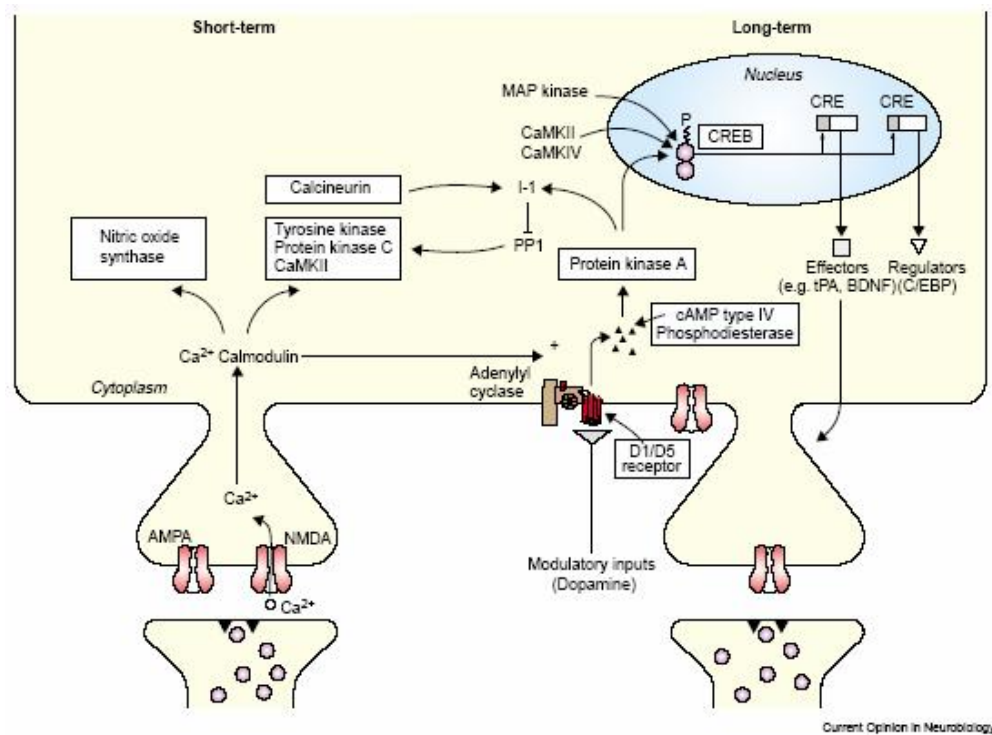


Figura 1. Eventos moleculares envolvidos nas fases precoce e tardia da LTP. **Influxo de cálcio no neurônio pós-sináptico e conseqüente ativação de CaMkII, PKC e calcineurin.** LTP de longa duração ocorre quando adenil-ciclase é ativado por cálcio, ou por receptor acoplado a proteína G. Aumento do AMPc ativa a PKA, que transloca-se para dentro do núcleo e fosforila CREB (ABEL e LATTAL, 2001).

### 1.1.2 Fases da memória

A memória é constituída de fases denominadas de aquisição, consolidação e evocação (ABEL e LATTAL, 2001). A fase de aquisição refere-se ao estágio no qual novas informações são adquiridas. A fase de consolidação da memória envolve processo de transformação da memória instável, recém adquirida, em memória estável (DASH et al., 2004). A hipótese de consolidação de memória foi aceita quando se observou que choques eletroconvulsivos induziam amnésia retrógrada em roedores, ou seja, prejudicavam a memória para a tarefa recém aprendida, quando aplicados logo após o treino de aquisição (DUNCAN apud McGAUGH, 2000).

A indução de LTP pode resultar em alguma forma de consolidação de memória, sendo que a síntese proteica é requerida somente para consolidação de memória de longa duração. Sugere-se que a fase tardia da LTP e a consolidação da memória, incluindo memória de medo, envolva a ativação do fator de transcrição CREB-1, mas apenas quando está fosforilada pela PKA (McGAUGH, 2000; BEAR et al., 2002; LYNCH, 2004). Já a fase de evocação da memória é o momento de re-exposição ao contexto ou estímulo que gerou o aprendizado prévio (ABEL E LATTAL, 2001).

### 1.1.3 Memória emocional

Eventos emocionais são melhores lembrados do que eventos neutros que são fracamente retidos ou requerem repetição para serem armazenados. A experiência emocional ativa a amígdala que desempenha papel essencial nas reações fisiológicas e comportamentais em situações com significado emocional (RICHTER-LEVIN e AKIRAV, 2003). A ativação da amígdala sinaliza, para outras estruturas encefálicas, que uma experiência emocional está ocorrendo, devendo ser armazenada e levando a um reforço da consolidação desta memória (MCGAUGH et al., 2002; RICHTER-LEVIN e AKIRAV, 2003). Por exemplo, influências modulatórias da amígdala basolateral regulam a consolidação da memória no hipocampo.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Hormônios do estresse liberado durante a experiência emocional também ativam mecanismos noradrenérgicos na amígdala basolateral, resultando em uma facilitação da memória (McGAUGH, 2000; Fig. 2).

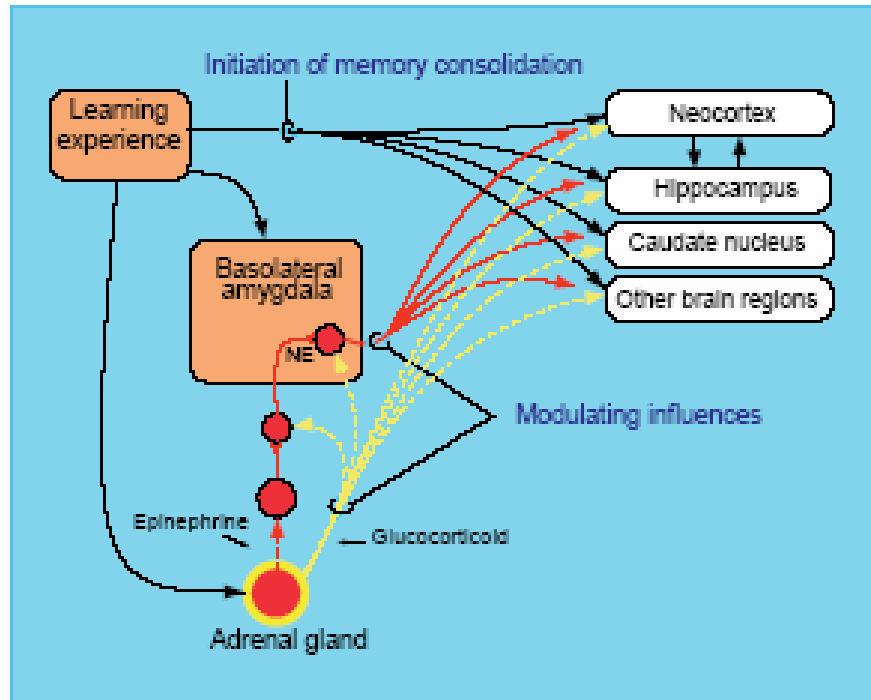


Figura 2. Amígdala basolateral na consolidação da memória emocional. **A experiência emocional leva a liberação de hormônios do estresse que conseqüentemente ativa a liberação de noradrenalina na amígdala basolateral que modula a consolidação da memória em outras regiões do encéfalo (McGAUGH, 2000).**



## 1.2 Labirinto em cruz elevado

Uma estratégia que tem permitido considerável avanço no estudo da neurobiologia da ansiedade é a utilização de modelos animais de ansiedade. O objetivo é simular em animais, sob condições controladas e reproduzíveis, os mesmos sinais observados em pacientes diagnosticados com distúrbio de ansiedade. Desse modo, se um dado distúrbio psiquiátrico pode ser simulado ou modelado em um animal, então esse modelo poderá ser uma ferramenta útil para a obtenção de avanços no nosso conhecimento sobre a neuroanatomia, a neurofisiologia e a neurofarmacologia dos diferentes distúrbios de ansiedade (RODGERS e COLE, 1994; HOLMES e RODGERS, 1998).

O animal possui a capacidade de processar estímulos e contextos físicos e de compará-los com expectativas formadas a partir de informações armazenadas na memória. Estas experiências prévias ou informações arquivadas são fundamentais para a detecção e avaliação de uma nova situação como potencialmente perigosa e escolha de uma estratégia comportamental a ser adotada para fugir ou evitar situações perigosas e manter sua sobrevivência (GRAEFF, 1990).

A interpretação de um estímulo, ou situação, como sendo perigosa e a escolha da estratégia de defesa a ser adotada, bem como o controle de sua execução depende de operações de natureza cognitiva (GRAEFF, 1994). Desta maneira a experiência geradora de medo é aprendida e memorizada por longo período de tempo. Assim, medo representa um modelo para decifrar os mecanismos fundamentais de aprendizagem e memória emocional (FENDT e FANSELOW, 1999).

O fato da ansiedade clínica se expressar sob a forma de diferentes distúrbios abre a perspectiva de estudar no mesmo modelo diferentes tipos de distúrbios e conseqüentemente expandir o conhecimento da neurobiologia dos distúrbios da ansiedade. Essa alternativa tem sido explorada através do paradigma Exposição1/Exposição 2 ( $E_1/E_2$ ) no labirinto em cruz elevado (LCE; HANDLEY e MITHANI, 1984), um modelo animal de ansiedade (HOGG, 1996); o paradigma baseia-se em expor o animal duas vezes ao LCE, possibilitando assim, estudar o efeito da experiência prévia sobre o comportamento futuro. Por este motivo o LCE é também

utilizado para o estudo da emocionalidade relacionada com aprendizado e memória (CAROBREZ et al., 2001).

Dentre os modelos animais de ansiedade aceitos pela literatura científica o LCE parece ser um dos mais difundidos. É rápido, simples e de baixo custo, além de não utilizar choques elétricos ou privação de água/alimento como estímulo aversivo e sim estímulos incondicionados de medo como novidade e espaços abertos (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

O LCE é constituído de duas passarelas, dispostas em forma de uma cruz simétrica, tendo dois braços opostos fechados por paredes laterais e outros dois braços opostos abertos. Esse modelo é baseado no comportamento exploratório de roedores (LISTER, 1990), ou seja, no medo natural de lugares abertos e elevados que geram um conflito aproximação/ esquivia (MONTGOMERY, 1955). É um método de mensuração de ansiedade que requer um teste de cinco minutos, tempo em que o comportamento de esquivia dos braços abertos é marcante (RODGERS et al., 1997).

### 1.2.1 Validação do labirinto em cruz elevado

O LCE já foi validado do ponto de vista etológico (LISTER, 1990), fisiológico e farmacológico (PELLOW et al., 1985). A validação comportamental é demonstrada durante a exploração ao LCE, quando os animais exibem comportamentos típicos de medo, tal como congelamento e avaliação de risco (RODGERS et al., 1997) e esquivia dos braços abertos, com preferência em explorar as áreas protegidas do LCE, tais como os braços fechados (PELLOW et al., 1985). A validação fisiológica deve-se ao aumento significativo de corticosterona plasmática em animais confinados nos braços abertos quando comparados com o confinamento nos braços fechados. Além disso, animais confinados nos braços abertos exibem elevada defecação. Já a validação farmacológica resulta de estudos farmacológicos demonstrando que drogas ansiolíticas levam ao aumento da exploração dos braços abertos, representada pelo aumento do número de entrada e tempo de permanência nos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas reduzem estas variáveis (PELLOW et al., 1985).

### 1.2.2 Estímulo ansiogênico no labirinto em cruz elevado

De acordo com Treit e colaboradores (1993), a esquia dos braços abertos é influenciada pela ausência de superfícies verticais, o que impede o comportamento tigmotático dos animais (exploração do ambiente através das vibrissas), e conseqüentemente, reduz a exploração nesse tipo de braço.

Por outro lado, Pereira e colaboradores (2005) demonstraram que ratos tendem a explorar as áreas menos iluminadas do LCE (braços fechados), evitando aquelas mais iluminadas (braços abertos). Assim, quanto maior a diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados do labirinto, maior tende a ser o conflito do animal em explorar essas áreas, gerando, assim, a preferência em explorar os braços menos iluminados do LCE. Por outro lado, quanto menor a diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados do labirinto, maior a dificuldade do animal em discriminar áreas com maior ou menor luminosidade, levando a redução do conflito e aumento da exploração nos braços abertos. Desse modo, a literatura indica que a preferência pelos braços fechados do LCE é determinada não só pela ausência de superfícies verticais que impede a tigmotaxia por parte dos animais (CARDENAS et al., 2001), mas também pela sua capacidade de discriminar, no campo exploratório, áreas com maior ou menor nível de luminosidade. Assim, os animais evitam explorar não só espaços abertos, mas também aqueles mais iluminados do LCE (PEREIRA et al., 2005).

### 1.2.3 A origem da ansiedade no labirinto em cruz elevado

Quando colocado no LCE pela primeira vez, o animal depara-se com situações distintas, ou seja, espaços abertos ou desprotegidos (representados pelos braços abertos) e espaços fechados ou protegidos (representados pelos braços fechados). Durante a exploração instala-se uma situação de conflito no animal, caracterizada por uma pulsão exploratória motivada talvez por curiosidade ou busca de um companheiro de espécie, associada a uma pulsão para evitar a exploração

(MONTGOMERY, 1955). O substrato neuronal para o conflito aproximação/esquiva pode incluir a amígdala, formação hipocampal, área hipotalâmica medial e substância cinzenta periaquedutal, áreas relacionadas aos comportamentos de defesa, e que estão ativadas após exposição ao LCE (SILVEIRA et al., 1993). Esse conflito aproximação/esquiva tem sido considerado análogo a ansiedade (GRAY, 1988) e pode ser amenizado por drogas ansiolíticas clássicas como os benzodiazepínicos (BDZ), na medida em que essas drogas reduzem o nível de medo do animal (FILE et al., 1990).

Em uma segunda exposição ao LCE constata-se um aumento da esquiva dos braços abertos em relação à primeira exposição (TREIT et al., 1993), sugerindo que a experiência prévia nos braços abertos durante a primeira exposição é o fator crucial no processo de aquisição de esquiva (FILE e ZANGROSSI, 1993). Além disso, drogas do tipo BDZ são eficazes apenas se administradas em animais sem experiência prévia ao LCE; animais previamente expostos ao LCE são refratários ao efeito ansiolítico/anticonflito dos BDZ. Esse fenômeno foi originalmente denominado por “*One Trial Tolerance*” (OTT; File et al., 1990) e parece envolver uma mudança qualitativa no tipo de medo entre a primeira e segunda exposição (FILE e ZANGROSSI, 1993), de um tipo de medo sensível, para um tipo insensível aos BDZs (CRUZ- MORALES et al., 2002).

A prevenção do OTT ocorre quando o tempo de exploração dos animais na primeira exposição é limitado a 1 minuto de duração (DAL-CÓL et al., 2003), sugere-se que a redução do tempo disponível para exploração do LCE resultaria em menos tempo para adquirir informações sobre o ambiente, prejudicando dessa maneira, a aprendizagem da esquiva dos braços abertos durante a primeira exposição. A perda do efeito ansiolítico dos BDZ na segunda exposição ao LCE parece ser modulada na amígdala e hipotálamo medial, visto que a desativação do núcleo basolateral da amígdala após a primeira exposição, com lidocaína (FILE et al., 1998) e desativação do hipotálamo dorsomedial (FILE et al., 1999), antes da segunda exposição mantém o efeito ansiolítico dos BDZs na segunda exposição.

Rodgers e colaboradores (1996) e Dal-Cól e colaboradores (2003), demonstraram que a aprendizagem da esquiva dos braços abertos inicia-se logo nos primeiros minutos (2ª minuto) da primeira exposição e aumenta progressivamente ao longo do tempo, com os animais exibindo elevada esquiva dos braços abertos no

adquirida durante a primeira exposição, se mantém já no início da segunda exposição ao LCE, usualmente 24 horas após. Esses dados indicam que não só comportamento de esquia, em um dado minuto da primeira exposição, é influenciado pelo minuto anterior, mas também que o comportamento de esquia na segunda exposição é determinado pela experiência prévia ao labirinto.

Desse modo a exploração do LCE induz a aquisição, consolidação e evocação de memória emocional relacionadas à exploração de áreas potencialmente perigosas do labirinto, tais como os braços abertos (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; PEREIRA et al., 2005).

A literatura tem demonstrado que processos de plasticidade neural, tais como aprendizagem e memória, podem ser modulados por múltiplos sistemas neuroquímicos. Por exemplo, a acetilcolina é um importante neurotransmissor que participa de processos de aprendizagem. A microinjeção de agonistas ou antagonistas de receptores colinérgicos na amígdala, striatum e hipocampo podem, respectivamente, aumentar ou prejudicar a aprendizagem e a memória em roedores (PEPEU e GIOVANNINI, 2004; GOLD, 2003). Ragozzino e colaboradores (1999), também demonstraram que há aumento da liberação de acetilcolina hipocampal durante tarefa relacionada à memória espacial. Além disso, existem evidências de uma ligação entre sistema colinérgico hipocampal, LTP e aprendizado (IGA et al., 1996; BLITZER et al., 1990).

Processos de plasticidade neuronal parecem ser igualmente modulados pelo sistema noradrenérgico, visto que a administração sistêmica de Clonidina (um agonista dos receptores do tipo  $\alpha_2$  da noradrenalina) induz amnésia em camundongos submetidos ao teste de esquia passiva (GALEOTTI et al., 2004b). Além disso, a administração de clonidina tem se mostrado ansiolítica em ratos submetidos ao LCE (JOHNSTON e FILE, 1989).

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no encéfalo e na medula espinhal (KANDEL et al., 2003), também está relacionado com a plasticidade neural (RIEDEL et al., 2003), ansiedade (BERGINK et al., 2004) e LTP (KANDEL et al., 2003; RIEDEL et al., 2003). Diferentes estudos sugerem a participação dos receptores do tipo NMDA do glutamato na formação da memória espacial, já que administração sistêmica e intra-hipocampal de antagonistas desses receptores em ratos e camundongos, prejudicou a aprendizagem/memória no labirinto aquático e

sistêmica de antagonistas NMDA, também causou prejuízo de memória emocional em ratos (DA CUNHA et al., 2005) e camundongos (HLINAK e KREJCÍ, 2002).

A síntese de óxido nítrico, catalisada pela ação da enzima NO sintase, também é importante na aprendizagem/memória emocional. Ratos tratados de forma sistêmica com L-NAME (inibidor de NOS) exibiram aumento da exploração dos braços abertos no LCE, indicando assim, um efeito do tipo ansiolítico (FARIA et al., 1997). Efeito ansiolítico similar foi observado em ratos tratados com Agmatina, considerada um inibidor endógeno da síntese de NO (ARICIOGLU e ALTUNBAS, 2003; LAVINSKY et al., 2003).

NO também tem sido considerado um mensageiro retrógrado (KANDEL et al., 2003), que influencia a transmissão sináptica na célula pré-sináptica e promove plasticidade sináptica no hipocampo, amígdala, estriado, córtex cerebral e cerebelo. Conseqüentemente inibidores de NOS afetam alguns tipos de aprendizagem e memória (PRAST e PHILIPPU, 2001).

Roedores tratados com L-NAME demonstraram prejuízo na aprendizagem/memória emocional nos paradigmas E1/E2 (PEREIRA, 2003) e latência de transferência no LCE (DA CUNHA et al., 2005), bem como no labirinto em T elevado (CALIXTO et al., 2001) e no teste de step-down (BERNABEU et al., 1995).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com drogas amnésicas nas diferentes fases da memória emocional de ratos no Labirinto em Cruz Elevado.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a administração Pré-E<sub>1</sub> de Escopolamina (antagonista de receptores muscarínicos; 0,5, 1,0 e 4,0mg/kg), Clonidina (agonista de receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos; 0,05, 0,1 e 0,2mg/kg), Agmatina (Inibidor da enzima NOS; 20 e 40mg/kg) e MK801(antagonista de receptores NMDA; 0.075 e 0,1 mg/kg) poderia alterar a aquisição da elevada esquiwa dos braços abertos, exibida por ratos, durante a E<sub>2</sub> no LCE .
- Verificar se a administração de Escopolamina (1,0mg/kg), Agmatina (40mg/kg), Clonidina (0,2mg/kg), e MK801 (0,1 mg/kg) após a primeira exposição (Tempo Pós-E<sub>1</sub> de 0, 30 e 180 minutos) poderia alterar a consolidação da elevada esquiwa dos braços abertos, exibida por ratos, durante a E<sub>2</sub> no LCE.
- Verificar se a administração Pré-E<sub>2</sub> de Escopolamina (1,0mg/kg), Agmatina (40mg/kg), Clonidina (0,2mg/kg), e MK801 (0,1 mg/kg) poderia alterar a evocação da elevada esquiwa dos braços abertos, exibida por ratos, durante a E<sub>2</sub> no LCE.



## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados no desenvolvimento da pesquisa 318 Ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com aproximadamente 2 meses de idade, pesando entre 230 e 330 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e transportados para o Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Fisiologia da mesma Universidade. Os animais foram acomodados em grupos de cinco por caixa de polipropileno (49 X 34 X 16cm) forrada com serragem.

Estes animais foram submetidos a 7 dias de adaptação no biotério do Laboratório de Neurobiologia (CFS) para ambientação às novas condições, com livre acesso a água e ração padrão (NUVILAB CR-1) e temperatura mantida em  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Um ciclo claro-escuro de 12 horas foi estabelecido com as luzes acendendo às seis horas. Os animais foram manipulados apenas para limpeza e troca das caixas a cada quarenta e oito horas, pesagem e administração de drogas. Os experimentos foram realizados no período vespertino (13:00-17:00 horas) com o observador fora da sala de experimentação.

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pela CEUA.

### 3.2 Drogas

Para os experimentos foram utilizados Escopolamina (ESC; antagonista receptor muscarínico), Clonidina (CLO; agonista receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico), Agmatina (AGM; inibidor de NOS) e Mk801 (antagonista receptor NMDA) obtidas da Tocris Cookson Inc (EUA). As drogas foram diluídas em salina (0,9%). A administração das drogas foi por via intraperitoneal (i.p.), na proporção de 0,1 ml/100g de peso.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



### 3.3 Labirinto em cruz elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando uma cruz simétrica com quatro braços de dimensões idênticas (50 cm de comprimento e 10 cm de largura; Fig. 3). Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de 40 cm de altura e são chamados de braços fechados. Estas paredes são de vidro revestido por uma película opaca, fixada na superfície externa do vidro. Com esta configuração (LCE fumê) obteve-se os seguintes níveis de lux nos diversos ambientes do LCE: braços fechados 240 lux, braços abertos 336 lux, quadrado central 376 lux e o gradiente entre braços abertos e fechados 96 lux. Os dois braços restantes, denominados braços abertos são circundados apenas por uma pequena borda de acrílico transparente de 1cm de altura para diminuir a incidência de queda dos animais. Na junção entre os braços delimita-se uma área central, denominada quadrado central (10 x 10cm). O labirinto como um todo é elevado 50cm do solo. Para a iluminação foram utilizadas quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, suspensas a 1metro dos braços (Fig. 4).



**Figura 3. O Labirinto em Cruz Elevado (LCE).**



**Figura 4. Sala de experimentação e iluminação.**

### **3.4 Procedimentos**

#### **3.4.1 Experimento 1 (Aquisição de esquiva dos braços abertos no LCE)**

Para verificar a aquisição de esquiva dos braços abertos um grupo de 130 animais foi subdividido em subgrupos, os quais receberam um dos seguintes tratamentos por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes da primeira exposição ao LCE ( $E_1$ ): salina 0,9%( $n=31$ ); ESC 0,5 ( $n=9$ ), 1,0 ( $n=9$ ) e 4,0mg/kg ( $n=14$ ); CLO 0,05 ( $n=7$ ), 0,1( $n=14$ ) e 0,2mg/kg ( $n=5$ ); AGM 20 ( $n=7$ ) e 40mg/kg ( $n=13$ ) e MK801 0,075 ( $n=8$ ) e 0,1 mg/kg ( $n=13$ ). Cada exposição teve duração de 5 minutos tendo início com a cuidadosa colocação do animal no quadrado central do labirinto, voltado para um dos braços fechados para livre exploração ( $E_1$ ). Após este tempo o animal foi recolocado em sua caixa de origem. Vinte e quatro horas após  $E_1$ , cada animal foi re-exposto ( $E_2$ ) ao LCE sem administração de drogas. Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após cada animal ser exposto ao LCE, este foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool 20%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo do experimento.

### 3.4.2 Experimento 2 (Consolidação de esquia dos braços abertos no LCE)

Para verificar a consolidação de esquia dos braços abertos foram utilizados 3 tempos diferentes de administração de droga: imediatamente, 30 minutos e 180 minutos após  $E_1$ .

Um grupo de 139 animais foi subdividido em 3 subgrupos, os quais receberam um dos seguintes tratamentos via i.p.:

-*Grupo 1* (Tempo de consolidação 0)- imediatamente após  $E_1$  (n=55): salina 0,9% (n=18); ESC 1,0 mg/kg (n=10); AGM 40mg/kg (n=10); CLO 0,2mg/kg (n=9); e MK801 0,1mg/kg (n=8).

-*Grupo 2* (Tempo de consolidação 30)- trinta minutos após  $E_1$  (n=46): salina 0,9% (n=10); ESC 1,0mg/kg (n=10); AGM 40mg/kg (n=7); CLO 0,2mg/kg (n=10) e MK801 0,1mg/kg (n=9).

-*Grupo 3* (Tempo de consolidação 180)- três horas após  $E_1$  (n=38): salina 0,9% (n=7); ESC 1,0mg/kg (n=9); AGM 40mg/kg (n=8); CLO 0,2mg/kg (n=9) e MK801 0,1mg/kg (n=5).

Vinte e quatro horas após  $E_1$ , cada grupo foi re-exposto ao LCE, sem administração de drogas, conforme descrito no experimento 1.

### 3.4.3 Experimento 3 (Evocação de esquia dos braços abertos no LCE)

Para verificar a evocação de esquia dos braços abertos um grupo de 49 animais foi dividido em subgrupos e submetidos à  $E_1$  no LCE, sem administração prévia de drogas. Vinte e quatro horas depois, receberam um dos seguintes tratamentos via i.p., 30 minutos antes de serem re-expostos ao LCE, conforme descrito no experimento 1: salina 0,9% (n=12); ESC 1,0mg/kg (n=12); AGM 40mg/kg (n=9); CLO 0,2mg/kg (n=11) e MK801 0,1mg/kg (n=5).

### 3.5 Coleta, transcrição e organização dos dados

As variáveis dependentes analisadas foram representadas pela porcentagem de entradas nos braços abertos (%EA), porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA), número de entradas nos braços abertos (EA) e número de entradas nos braços fechados (EF). O critério de definição de entrada e saída de braço foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora de um braço, respectivamente. A variável %EA foi calculada através da fórmula  $(EA / (EA + EF)) \times 100$ . A variável %TA foi calculada através da fórmula  $(T_A / T_T) \times 100$ , sendo  $T_A$  o tempo de permanência nos braços abertos e  $T_T$  o tempo total da sessão (5 minutos).

No experimento 1 para verificar a aquisição da esquiva dos braços abertos as variáveis independentes consideradas foram: “exposição” (primeira e segunda exposição ao LCE), “droga” (tratamento com droga) e “blocos de 1 minuto” (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª minuto). No experimento 2 para verificar a consolidação da esquiva dos braços abertos as variáveis independentes consideradas foram: “droga”, “blocos de 1 minuto” e “tempo de consolidação” (tempo de consolidação 0, 30 ou 180 ). No experimento 3 para verificar a evocação da esquiva dos braços abertos as variáveis independentes consideradas foram: “droga” e “blocos de 1 minuto”.

As sessões experimentais foram gravadas em VHS, sendo as variáveis dependentes posteriormente transcritas com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000). Os dados foram apresentados de duas formas: considerando o comportamento do animal no tempo total (análise do tempo total) de cada exposição ao LCE (5 minutos) e considerando o comportamento do animal em cada minuto separadamente (1º, 2º, 3º, 4º e 5º minuto, ou seja, em blocos de 1 minuto), o que viabilizou a análise temporal ou minuto a minuto dos comportamentos (%EA, %TA, EA e EF).

### 3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados por análise de variância de uma, duas ou três vias utilizando-se no experimento 1, para tempo total da exposição, fator 1: “droga” e fator 2: “exposição” e para análise temporal fator 1: “droga”, fator 2 “exposição” e fator 3: “blocos de 1 minuto”.

No experimento 2, para tempo total da exposição, fator 1: “droga” e fator 2: “tempo de consolidação” e para análise temporal fator 1: “droga”, fator 2: “tempo de consolidação” e fator 3: “blocos de 1 minuto”.

No experimento 3, para tempo total da exposição, fator 1: “droga” e para análise temporal fator 1: “droga” e fator 2: “blocos de 1 minuto”.

Tanto ANOVA de uma, duas ou três vias foram seguidas do teste de Duncan para múltiplas comparações, quando necessário. Apenas valores de probabilidade menores que 5% foram considerados significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AQUISIÇÃO DE MEMÓRIA EMOCIONAL NO LCE.

#### 4.1.1 Resultados de aquisição considerando-se o tempo total de exposição:

A tabela 1 apresenta o resultado geral da ANOVA em ratos submetidos a duas exposições consecutivas ao LCE, considerando-se o tempo total de cada exposição. A figura 5 apresenta, considerando o tempo total da exposição, a porcentagem de entrada, de tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados de ratos submetidos ao paradigma 1ª exposição/ 2ª exposição no LCE. O teste de Duncan indicou diminuição ( $p < 0.05$ ) na %EA (Fig. 5A) na segunda exposição, em relação a primeira, nos grupos tratados com salina, escopolamina (0.5 e 1.0mg/kg), clonidina (0.05 e 0.1mg/kg), agmatina (20 e 40mg/kg) e MK801 (0.075 e 0.1mg/kg). O grupo tratado com clonidina (0.2mg/kg) apresentou maior %EA na segunda exposição quando comparado com o grupo tratado com salina ( $p < 0.05$ ). Na figura 5B o teste de Duncan indicou redução na %TA na segunda exposição nos grupos salina, escopolamina (1.0mg/kg), clonidina (0.05 e 0.1mg/kg), agmatina (40mg/kg) e MK801 (0.075 e 0.1mg/kg) quando comparada com a primeira exposição ( $p < 0.05$ ).

O teste de Duncan também indicou que o grupo clonidina (0.2mg/kg) apresentou menor, enquanto que o grupo MK801 (0.075mg/kg) exibiu maior número de EA na primeira exposição, quando comparado com o grupo tratado com salina (Fig. 5C,  $p < 0.05$ ). Houve diminuição do número de EA na segunda exposição ( $p < 0.05$ ), quando comparado com a primeira exposição, somente nos grupos tratados com salina, agmatina (40mg/kg) e MK801 (0.075 e 0.1mg/kg). Os grupos tratados com clonidina (0.05 e 0.2mg/kg) exibiram menor número de EF na primeira exposição quando comparados com o grupo salina (Fig. 5D,  $p < 0.05$ ). O grupo tratado com clonidina (0.2mg/kg) apresentou aumento, enquanto o grupo tratado

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

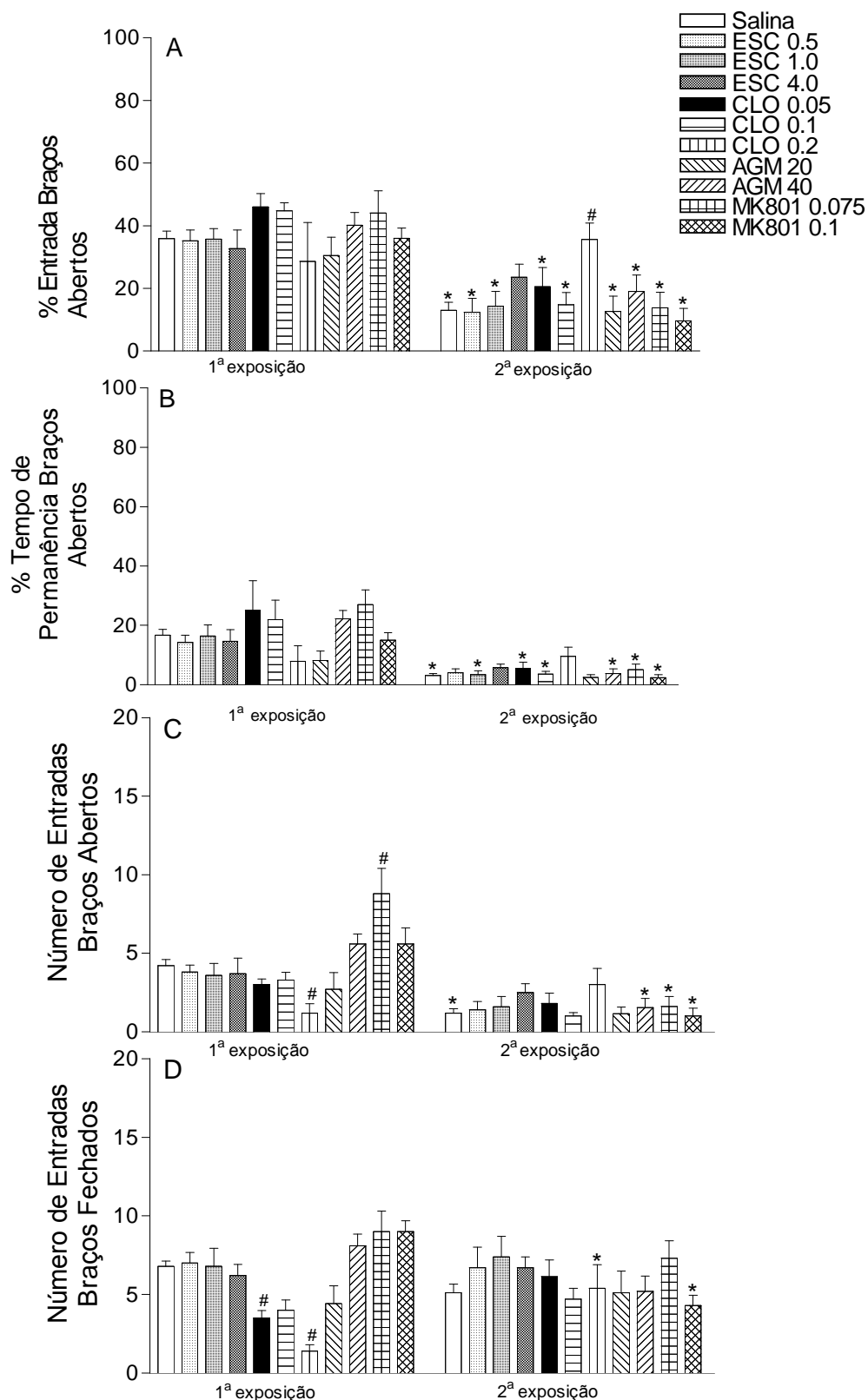
com MK801 (0.1mg/kg) apresentou diminuição, do número de EF na segunda exposição, em relação a primeira ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1: Aquisição de memória emocional no LCE**

Resultados da ANOVA de duas vias da análise do tempo total (5 minutos) indicando os efeitos principais e interações

Variáveis comportamentais	Droga	Exposição	Droga X Exposição
% EA	$F_{10,238} = 1.18; NS$	$F_{1,238} = 89.56; p < 0.0001$	$F_{10,238} = 1.79; NS$
% TA	$F_{10,238} = 1.36; NS$	$F_{1,238} = 71.19; p < 0.0001$	$F_{10,238} = 1.42; NS$
EA	$F_{10,238} = 2.76; p < 0.01$	$F_{1,238} = 62.90; p < 0.0001$	$F_{10,238} = 3.81; p < 0.0001$
EF	$F_{10,238} = 3.90; p < 0.0001$	$F_{1,238} = 0.20; NS$	$F_{10,238} = 3.38; p < 0.01$

Os ratos foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (primeira exposição/ segunda exposição) após administração de diferentes drogas em diferentes doses; NS indica valores de  $F$  não significantes.



**Figura 5. Porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos, tratados com diferentes drogas e submetidos ao paradigma primeira exposição e segunda exposição do LCE.** Os animais foram expostos por duas vezes (5 minutos cada exposição) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões. Cada grupo recebeu administração via i.p., de droga 30 minutos antes da primeira exposição ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e #  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina.



#### **4.1.2 Resultados de aquisição considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto (análise temporal)**

A tabela 2 apresenta o resultado geral da ANOVA de três vias para aquisição de memória emocional em ratos no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto.

**Tabela 2: Aquisição de memória emocional no LCE**

Resultados da ANOVA de três vias da análise minuto a minuto indicando os efeitos principais e interações

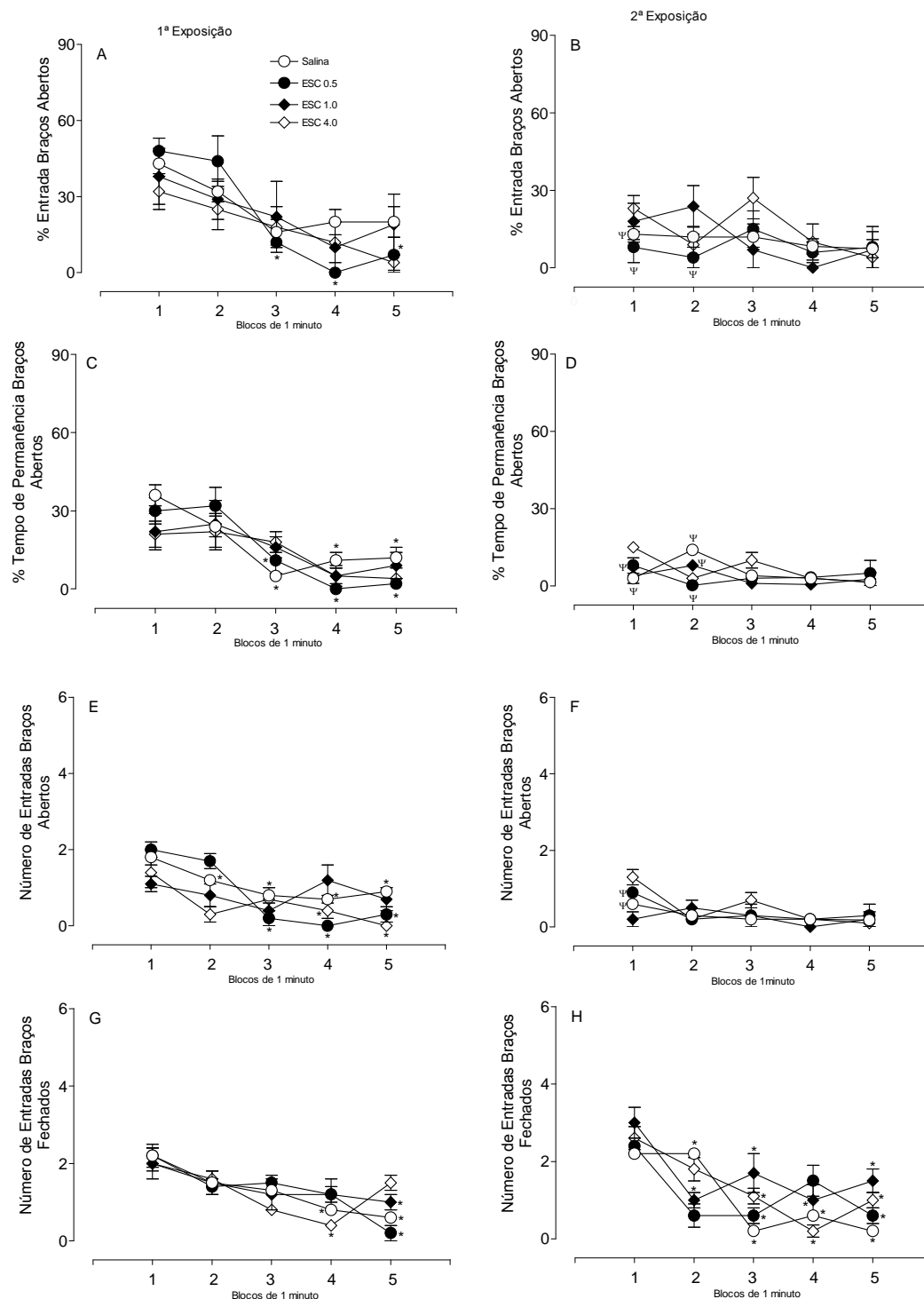
Fatores/interações	% EA	% TA	EA	EF
Droga	$F_{10,1081}=2.10;p<0.05$	$F_{10,1081}=2.97;p<0.01$	$F_{10,1080}=4.73;p<0.0001$	$F_{10,1081}=8.00;p<0.0001$
Exposição (Expo)	$F_{1,1081}=108.10;p<0.0001$	$F_{1,1081}=161.76;p<0.0001$	$F_{1,1080}=104.44;p<0.0001$	$F_{1,1081}=0.19;NS$
Blocos de 1 min. (Bl 1min)	$F_{4,1081}=36.08;p<0.0001$	$F_{4,1081}=31.61;p<0.0001$	$F_{4,1080}=48.41;p<0.0001$	$F_{4,1081}=82.27;p<0.0001$
Droga X Expo	$F_{10,1081}=5.02;p<0.0001$	$F_{10,1081}=3.41;p<0.01$	$F_{10,1080}=6.87;p<0.0001$	$F_{10,1081}=7.16;p<0.0001$
Droga X Bl 1 min.	$F_{40,1081}=0.81;NS$	$F_{40,1081}=0.58;NS$	$F_{40,1080}=0.66;NS$	$F_{40,1081}=1.17;NS$
Expo X Bl 1 min.	$F_{4,1081}=8.53;p<0.0001$	$F_{4,1081}=11.13;p<0.0001$	$F_{4,1080}=10.25;p<0.0001$	$F_{4,1081}=8.41;p<0.0001$
Droga X Expo X Bl 1 min.	$F_{40,1081}=0.66;NS$	$F_{40,1081}=0.59;NS$	$F_{40,1080}=0.75;NS$	$F_{40,1081}=0.71;NS$

Os ratos foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (primeira exposição/ segunda exposição) após administração de diferentes drogas em diferentes doses; NS indica valores de  $F$  não significantes.

A figura 6 apresenta a %EA, a %TA, o número de EA e EF de ratos submetidos ao paradigma 1ª exposição/ 2ª exposição no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. O teste de Duncan revelou diminuição na %EA (Fig. 6A) ao longo da primeira exposição apenas no grupo tratado com escopolamina na dose de 0.5mg/kg (3º, 4º e 5º minuto;  $p<0,05$ ). Também houve diminuição na %TA (Fig. 6C) ao longo da primeira exposição nos grupos tratados com salina (3º, 4º e 5º minuto;  $p<0,05$ ) e escopolamina (0.5mg/kg; 3º, 4º e 5º minuto;  $p<0,05$ ). Durante a segunda exposição, o teste de Duncan também indicou diminuição na %EA (Fig. 6B), nos grupos tratados com salina (1º minuto:  $p<0,05$ ) e escopolamina (0.5mg/kg; 1º e 2º minuto;  $p<0,05$ ), além de redução na %TA (Fig. 6D), nos grupos tratados com salina (1º e 2º minuto;  $p<0,05$ ) e escopolamina nas doses de 0.5 (1º e 2º minuto;  $p<0,05$ ) e 1.0mg/kg (2º minuto:  $p<0,05$ ), em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.

O teste de Duncan também revelou diminuição no número de EA (Fig. 6E) ao longo da primeira exposição: grupo salina (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), escopolamina 0.5 (3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 4.0mg/kg (4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ). Também houve diminuição no número de EF (Fig. 6G) ao longo da primeira exposição: grupo salina (4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), escopolamina 0.5 (5° minuto;  $p < 0,05$ ), 1.0 (5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 4.0mg/kg (4° minuto;  $p < 0,05$ ).

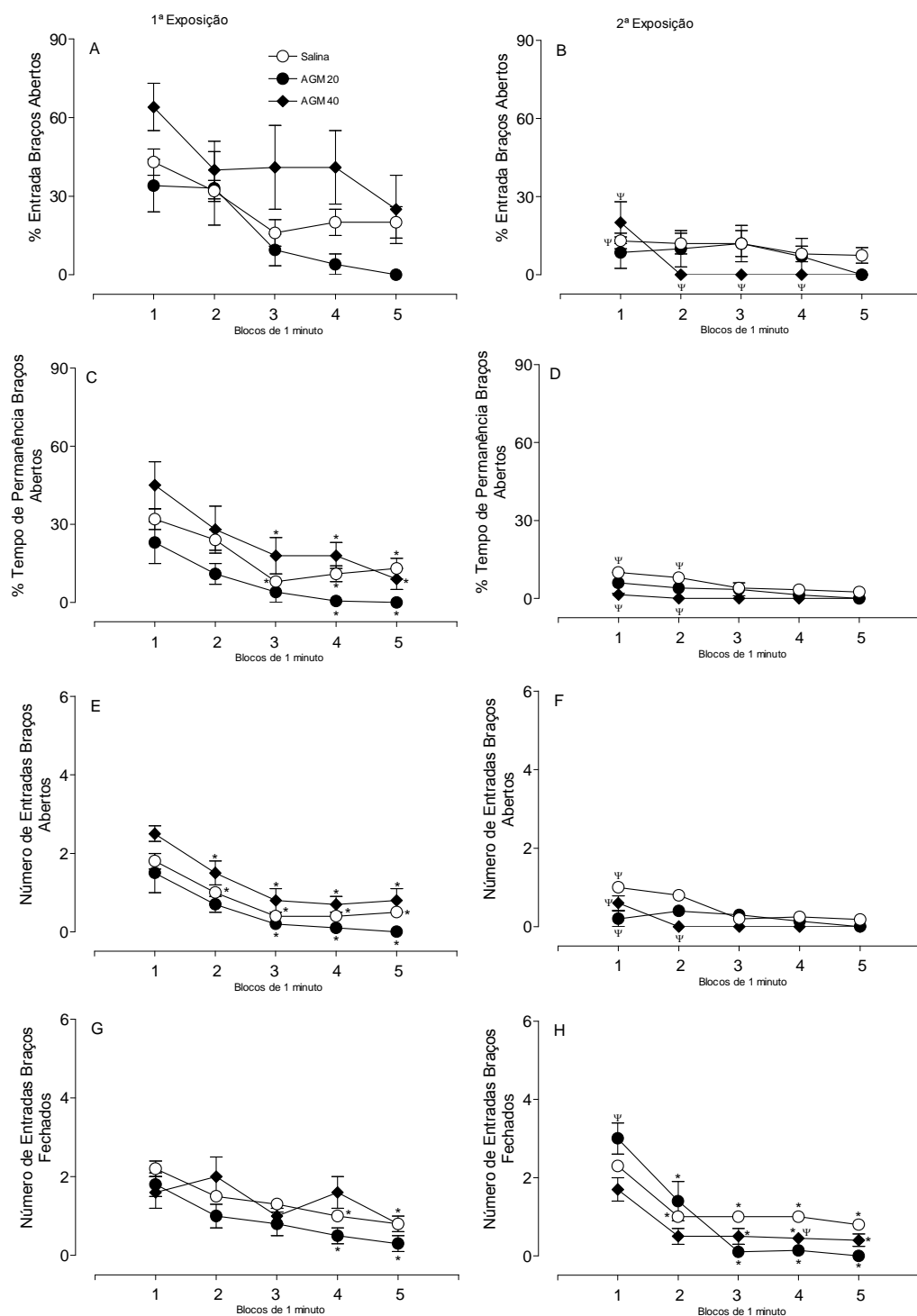
Na segunda exposição, o teste de Duncan indicou redução no número de EF ao longo do tempo (Fig. 6H): grupo salina (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), escopolamina 0.5 (3° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), 1.0 (2°, 3°, 4 e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 4.0mg/kg (3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ). Ainda na segunda exposição, houve diminuição do número de EA (Fig. 6F) nos grupos tratados com salina 0,9% (1° minuto:  $p < 0,05$ ) e escopolamina 0.5mg/kg (1° minuto:  $p < 0,05$ ), em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.



**FIGURA 6. Análise temporal das porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como dos números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE-Escopolamina. Os ratos receberam salina e escopolamina (ESC; 0.5, 1.0 e 4.0 mg/Kg), 30 minutos antes da 1ª exposição. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo 1º minuto,  $\psi$   $P < 0,05$  em relação ao respectivo minuto da 1ª exposição.**

A figura 7 apresenta a %EA e a %TA, o número de EA e EF de ratos submetidos ao paradigma 1ª exposição/ 2ª exposição no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. Na primeira exposição, o teste de Duncan não revelou alteração da %EA ao longo do tempo (Fig. 7A), mas indicou diminuição na %TA (Fig. 7C) ao longo da exposição nos grupos tratados com salina (3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), agmatina 20 (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e 40 mg/kg (3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ). Na segunda exposição, o teste de Duncan revelou diminuição na %EA (Fig. 7B) nos grupos tratados com salina (1º minuto;  $p < 0,05$ ) e agmatina 40mg/kg (1º, 2º, 3º e 4º minuto;  $p < 0,05$ ) e na %TA (Fig. 7D) (1º e 2º minuto;  $p < 0,05$ ) nos grupos tratados com salina e agmatina 40 mg/kg, em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.

O teste de Duncan também revelou diminuição do número de EA (Fig. 7E) ao longo da primeira exposição nos grupos tratados com salina (2º, 3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), agmatina 20 (3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e 40mg/kg (2º, 3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ). Também houve diminuição do número de EF (Fig. 7G) ao longo da primeira exposição nos grupos tratados com salina (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e agmatina na dose de 20mg/kg (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ). Na segunda exposição, houve diminuição no número de EF nos grupos tratados com salina (2º, 3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), agmatina 20 (2º, 3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e 40 mg/kg (3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) (Fig. 7H). Ainda na segunda exposição, houve redução do número de EA (Fig. 7F) nos grupos tratados com salina (1º minuto;  $p < 0,05$ ), agmatina 20 (1º minuto;  $p < 0,05$ ) e 40mg/kg (1º e 2º minuto;  $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo minuto da primeira exposição. O teste de Duncan também indicou diminuição do número de EF (Fig. 7H) no grupo tratado com agmatina na dose de 40mg/kg (4º minuto;  $p < 0,05$ ) e aumento do número de EF, no grupo tratado com agmatina 20mg/kg (1º minuto;  $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.



**Figura 7. Análise temporal da porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como dos números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE- Agmatina.** Os ratos receberam salina e agmatina (AGM, 20 e 40 mg/Kg), 30 minutos antes da 1ª exposição. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo 1º minuto,  $\psi$   $P < 0,05$  em relação ao respectivo minuto da 1ª exposição.

A figura 8 apresenta a %EA e a %TA, o número de EA e EF de ratos tratados com clonidina e submetidos ao paradigma 1ª exposição/ 2ª exposição no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. Na primeira exposição o teste de Duncan não revelou alteração na %EA ao longo do tempo, mas indicou diminuição na %TA (Fig. 8C) nos grupos tratados com salina (3º e 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina nas doses de 0.05 (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), 0.1 (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.2mg/kg (3º e 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) no decorrer da exposição. Ainda na primeira exposição, o grupo tratado com clonidina na dose de 0.05 mg/kg exibiu maior %TA no terceiro minuto ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo tratado com salina (Fig. 8C).

Na segunda exposição não houve alteração na %EA e na %TA ao longo da exposição. Entretanto, o teste de Duncan indicou diminuição da %EA (Fig. 8B) nos grupos tratados com salina (1º minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina nas doses de 0.05 (3º minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (1º minuto;  $p < 0,05$ ), em relação ao respectivo minuto da primeira exposição. Também houve diminuição na %TA (Fig. 8D) nos grupos tratados com salina (1º e 2º minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina 0.05 (2º e 3º minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (1º minuto;  $p < 0,05$ ), em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.

Durante a primeira exposição houve redução no número de EA (Fig. 8E) ao longo da exposição nos grupo tratados com salina (2º, 3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina 0.05 (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ). O teste de Duncan também revelou diminuição do número de EF (Fig. 8G) ao longo do tempo nos grupos tratados com salina (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina 0.05 (4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ). Ainda na primeira exposição, o grupo tratado com clonidina (0.2 mg/kg) exibiu menor número de EA (1º minuto) e de EF (1º e 2ºminuto) quando comparado ao grupo tratado com salina ( $p < 0,05$ ).

Na segunda exposição, o teste de Duncan indicou diminuição do número de EA (Fig. 8F) ao longo do tempo no grupo tratado com clonidina na dose de 0.2mg/kg (4º minuto;  $p < 0,05$ ) e diminuição do número de EA no grupo tratado com salina (1º minuto;  $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo minuto na primeira exposição. Também houve diminuição no número de EF ao longo da segunda exposição nos grupos

minuto;  $p < 0,05$ ), 0.1 (3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.2mg/kg (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ). O teste de Duncan indicou, ademais, aumento no número de EF (Fig. 8H) no grupo tratado com clonidina 0.2mg/kg (1° minuto;  $p < 0,05$ ), em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.

A figura 9 apresenta a %EA e a %TA, o número de EA e EF de ratos tratados com MK801 e submetidos ao paradigma 1ª exposição/ 2ª exposição no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto.

Na primeira exposição o teste de Duncan não indicou diferença significativa na %EA durante a exposição (Fig. 9A), mas revelou diminuição na %TA (Fig. 9C) ao longo do tempo nos grupos tratados com salina (3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), MK801 nas doses de 0.075 (3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (5° minuto;  $p < 0,05$ ). O teste de Duncan revelou, ademais, maior %TA no 2° minuto no grupo tratado com MK801 na dose de 0.075mg/kg, quando comparado com o grupo tratado com salina (Fig. 9C,  $p < 0,05$ ).

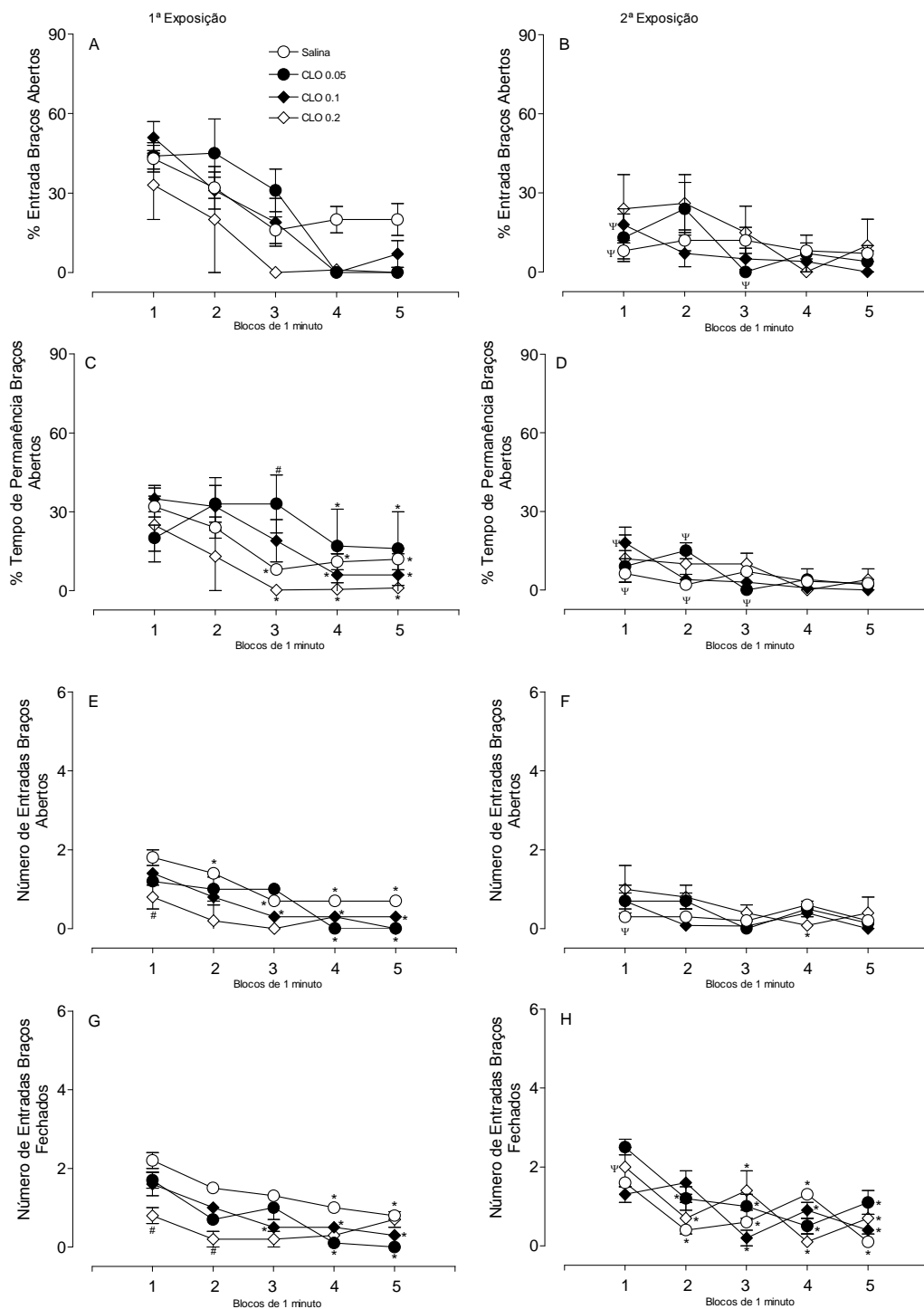
Na segunda exposição não houve alteração na %EA e na %TA ao longo do tempo. Entretanto, o teste de Duncan indicou redução na %EA (Fig. 9B) no grupo tratado com salina (1° minuto;  $p < 0,05$ ) MK801 0.075 (1°, 2° e 3° minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (1° e 2° minuto;  $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo minuto da primeira exposição. Também houve diminuição na %TA (Fig. 9D) nos grupos tratados com salina (1° e 2° minuto;  $p < 0,05$ ), MK801 0.075 (1° e 2° minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (2° minuto;  $p < 0,05$ ), em relação ao respectivo minuto da primeira exposição.

Na primeira exposição o teste de Duncan revelou diminuição do número de EA (Fig. 9E) ao longo do tempo nos grupos tratados com salina (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), MK801 0.075 (4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ). Houve diminuição do número de EF (Fig. 9G) no grupo tratado com salina (4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) no decorrer da primeira exposição. Ainda em relação à primeira exposição, o teste de Duncan revelou maior número de EA no 2° minuto, nos grupos tratados com MK801 0.075 e 0.1mg/kg, e no 3° minuto, no grupo tratado com 0.075mg/kg, em relação ao grupo tratado com salina ( $p < 0,05$ ).

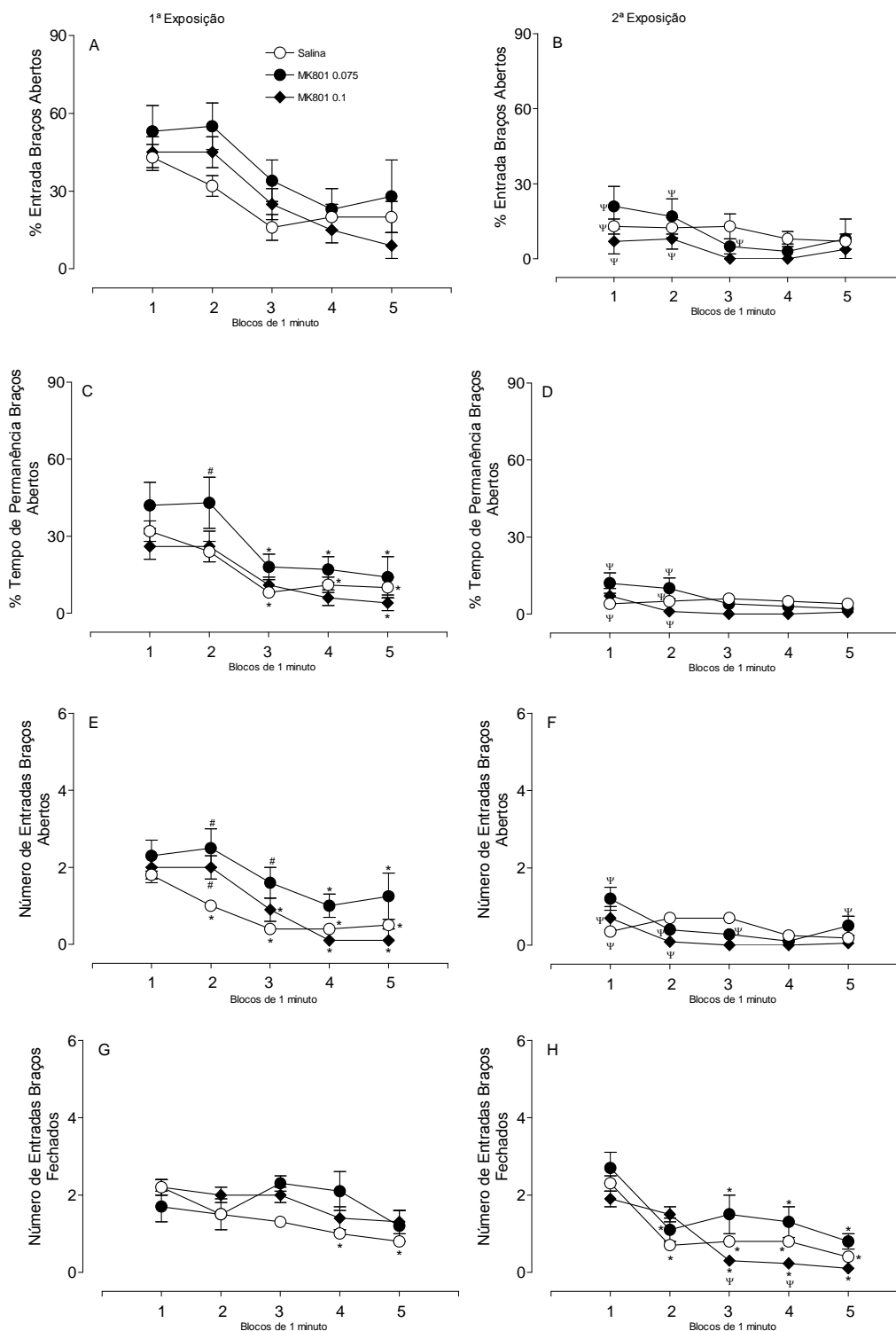
Na segunda exposição o teste de Duncan não indicou diferença significativa no número de EA (Fig. 9F), mas revelou diminuição do número de EF (Fig. 9H) ao longo do tempo nos grupos tratados com salina (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) MK801

teste de Duncan também indicou diminuição do número de EA (Fig. 9F) nos grupos tratados com salina (1° minuto;  $p < 0,05$ ), MK801 0.075 (1°, 2°, 3° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e 0.1mg/kg (1° e 2° minuto;  $p < 0,05$ ), em relação aos respectivos minutos da primeira exposição. Também houve redução no número de EF (Fig. 9H) no grupo tratado com MK801 0.1mg/kg (3° e 4° minuto;  $p < 0,05$ ), em relação aos respectivos minutos da primeira exposição.





**Figura 8. Análise temporal da porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como das números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE-Clonidina.** Os ratos receberam salina e clonidina (CLO, 0.05, 0.1 e 0.2 mg/Kg), 30 minutos antes da 1ª exposição. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo 1º minuto,  $\psi$   $P < 0,05$  em relação ao respectivo minuto da 1ª exposição e #  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina no respectivo minuto.



**Figura 9. Análise temporal da porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos, bem como dos números de entrada nos braços abertos e fechados de ratos na primeira (A, C, E e G) e segunda exposição (B, D, F e H) ao LCE-MK801. Os ratos receberam salina e MK801 (0.075 e 0.1 mg/Kg), 30 minutos antes da 1ª exposição. Os dados são representados como a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo 1º minuto,  $\psi$   $P < 0,05$  em relação ao respectivo minuto da 1ª exposição e #  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina no respectivo minuto.**

## 4.2 CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA EMOCIONAL NO LCE:

### 4.2.1 Resultados de consolidação considerando-se o tempo total de exposição:

A tabela 3 apresenta o resultado geral da ANOVA durante a segunda exposição ao LCE, considerando-se o tempo total de exposição. A figura 10 apresenta a %EA, %TA e os números de EA e EF de ratos submetidos a 2ª exposição no LCE. Os animais foram expostos (5 minutos) ao LCE sem administração prévia de drogas (primeira exposição) e imediatamente após (tempo de consolidação 0), receberam administração de drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. O teste de Duncan não indicou diferença entre os grupos na %EA (Fig. 10A), na %TA (Fig. 10B), no número de EA (Fig. 10C) e no número de EF (Fig. 10D).

**Tabela 3: Consolidação de memória emocional no LCE**

Resultados da ANOVA de duas vias da análise do tempo total (5 minutos) indicando os efeitos principais e interações

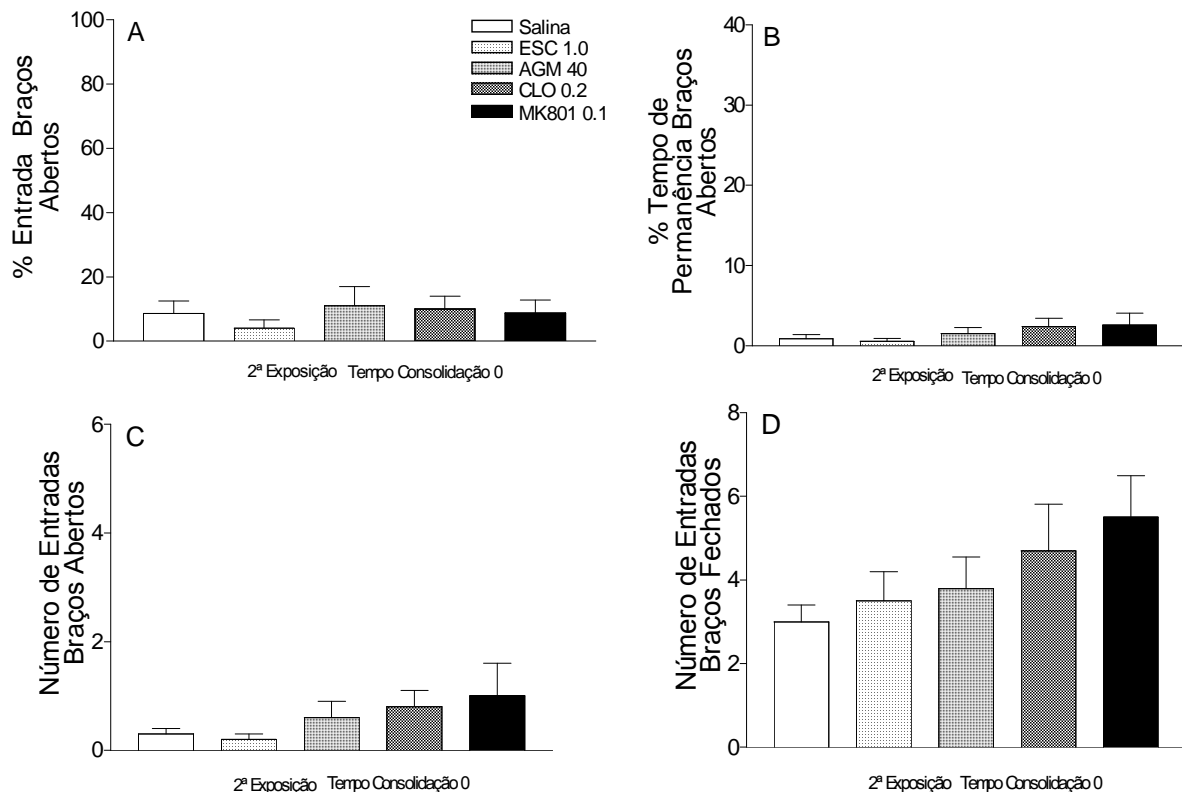
Variáveis comportamentais	Droga	Tempo de Consolidação	Droga X Tempo de Consolidação
% EA	$F_{4,124}=0.24$ ;NS	$F_{2,124}=0.87$ ;NS	$F_{8,124}=1.24$ ;NS
% TA	$F_{4,124}=0.40$ ;NS	$F_{2,124}=3.49$ ;p< 0.05	$F_{8,124}=2.47$ ;p< 0.05
EA	$F_{4,124}=0.17$ ;NS	$F_{2,124}=2.04$ ;NS	$F_{8,124}=1.69$ ;NS
EF	$F_{4,124}=1.04$ ;NS	$F_{2,124}=0.56$ ;NS	$F_{8,124}=1.06$ ;NS

Os ratos foram re-expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (segunda exposição). Este animais receberam após a primeira exposição administração, via I.P., de diferentes drogas em diferentes tempos; NS indica valores de  $F$  não significantes.

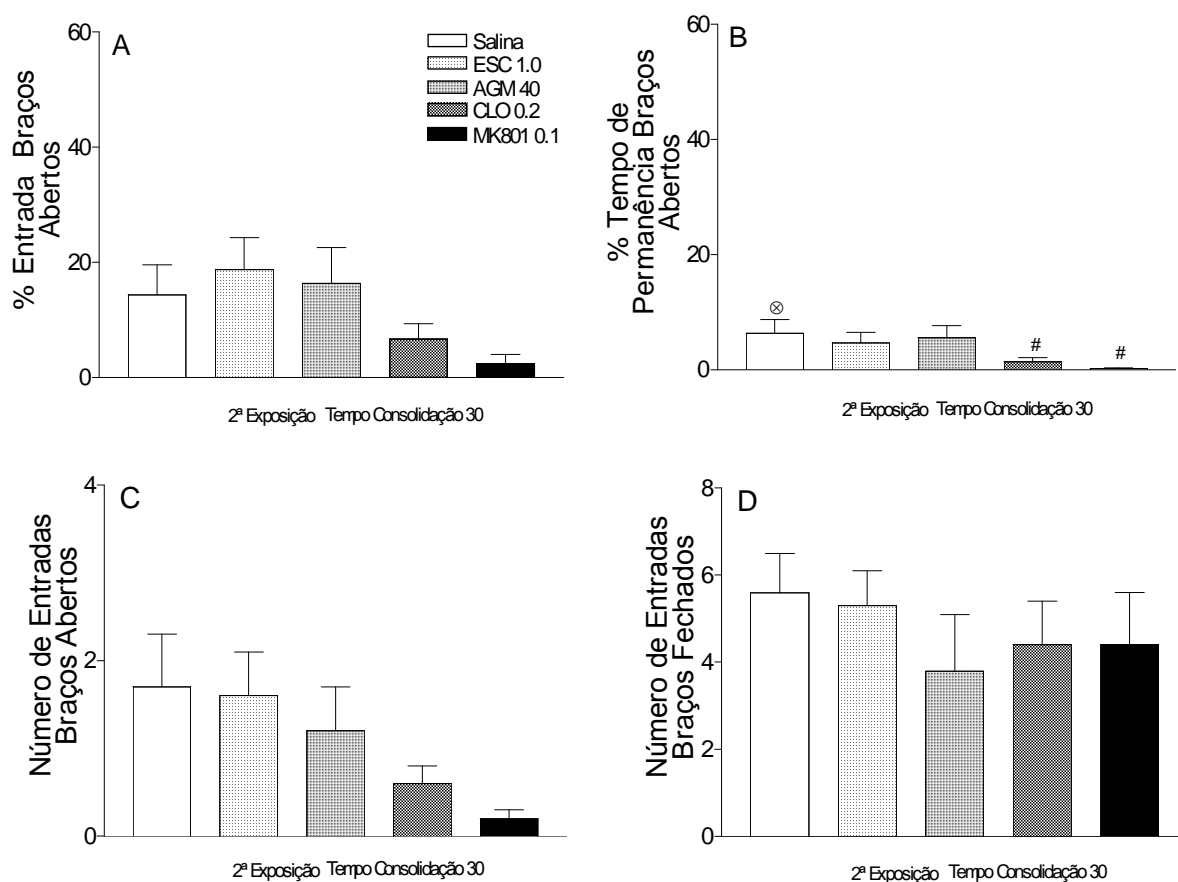
A figura 11 apresenta a %EA, %TA e os números de EA e EF de ratos submetidos à 2ª exposição ao LCE. Os animais foram expostos (5 minutos) ao LCE sem administração prévia de drogas (primeira exposição) e 30 minutos após (tempo de consolidação 30), receberam administração de drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. O teste de Duncan indicou menor %TA (Fig. 11B) nos grupos tratados com clonidina (0.2mg/kg) e MK801 (0.1mg/kg), quando comparados ao grupo de animais tratado com salina (p< 0,05). O teste de Duncan também indicou maior %TA no grupo tratado com salina,

quando comparado com o grupo tratado com salina imediatamente após a primeira exposição (consolidação 0,  $p < 0,05$ ). O teste de Duncan não indicou diferença significativa entre os grupos, quanto à %EA (Fig. 11A), ao número de EA (Fig. 11C) e ao número de EF (Fig. 11D).

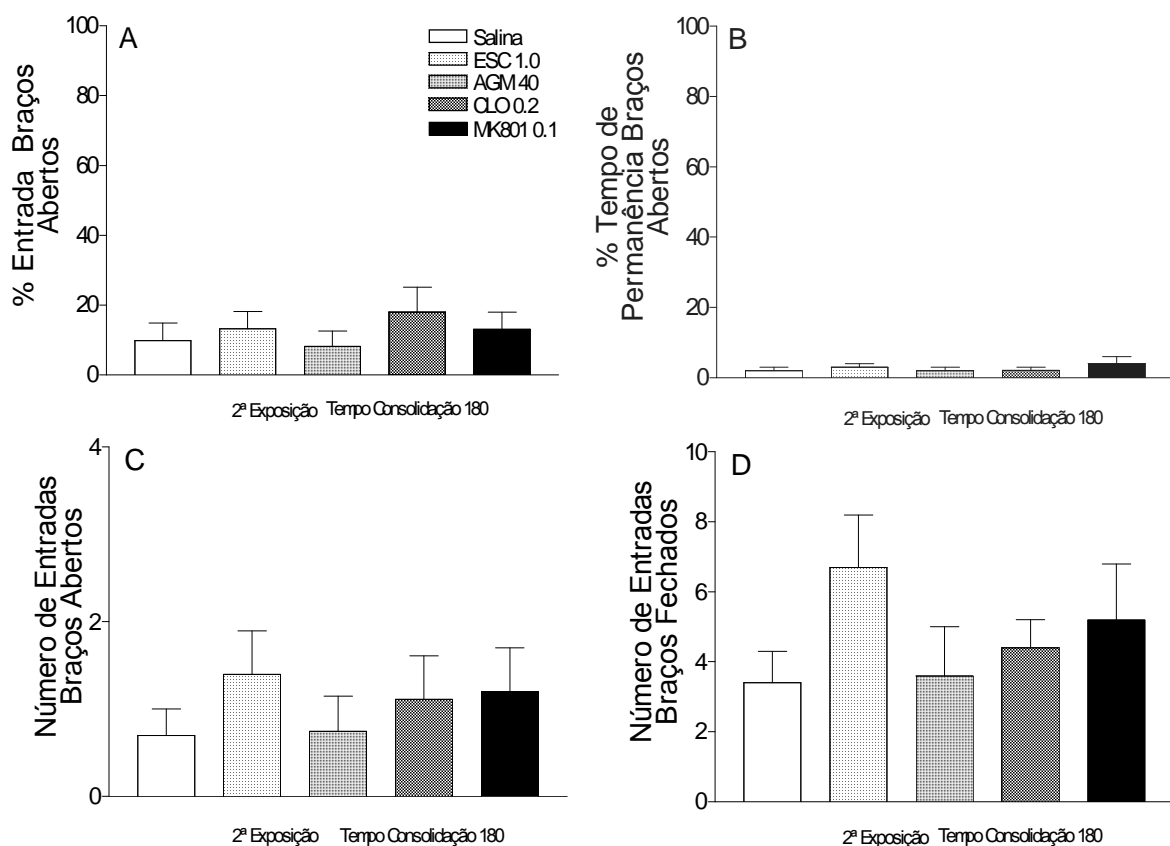
A figura 12 apresenta, considerando o tempo total de exposição, a %EA, %TA, o número de EA e o número de EF de ratos submetidos à 2ª exposição no LCE. Os animais foram expostos ao LCE sem administração prévia de drogas e, 180 minutos (tempo de consolidação 180) após, receberam tratamento com drogas. O teste de Duncan não indicou diferença significativa na %EA (Fig. 12A), na %TA (Fig. 12B), no número de EA (Fig. 12C) e no número de EF (Fig. 12D).



**Figura 10. Porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 0.** Os animais foram expostos (5 minutos) ao LCE sem administração prévia de drogas (primeira exposição) e imediatamente após (tempo de consolidação 0) receberam, via i.p., administração de drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, #  $P < 0,05$  em relação ao grupo salina.



**Figura 11. Porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 30.** Os animais foram expostos (5 minutos) ao LCE sem administração prévia de drogas (primeira exposição) e após 30 minutos (tempo de consolidação 30) receberam, via i.p., administração de drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, #  $P < 0,05$  em relação ao grupo salina e  $\otimes$   $P < 0,05$  em relação ao grupo salina no tempo de consolidação 0.



**Figura 12. Porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 180.** Os animais foram expostos (5 minutos) ao LCE sem administração prévia de drogas (primeira exposição) e após 180 minutos (tempo de consolidação 180) receberam, via i.p., administração de drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, #  $P < 0,05$  em relação ao grupo salina.

#### **4.2.2 Resultados de consolidação considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto (análise temporal)**

A tabela 4 apresenta o resultado geral da ANOVA de três vias para consolidação de memória emocional em ratos no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto.

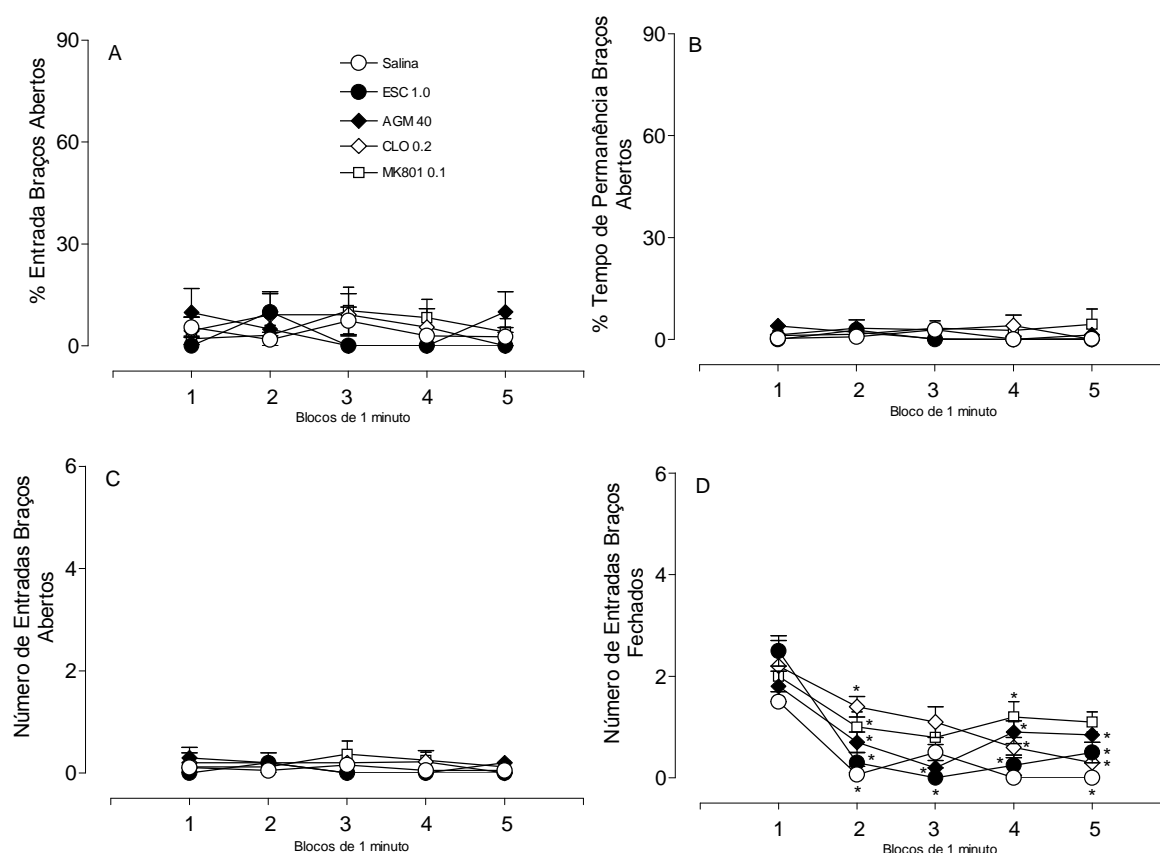
**Tabela 4: Consolidação de memória emocional no LCE**

Resultados da ANOVA de três vias da análise minuto a minuto indicando os efeitos principais e interações

Fatores/interações	% EA	% TA	EA	EF
Droga	$F_{4,620}=0.99$ ;NS	$F_{4,620}=0.60$ ;NS	$F_{4,620}=0.25$ ;NS	$F_{4,620}=2.23$ ;NS
Consolidação (Consol)	$F_{2,620}=2.75$ ;NS	$F_{2,620}=4.90$ ;p< 0.05	$F_{2,620}=2.54$ ;NS	$F_{2,620}=1.11$ ;NS
Blocos de 1 min. (Bl 1 min.)	$F_{4,620}=1.23$ ;NS	$F_{4,620}=2.77$ ;p< 0.05	$F_{4,620}=1.56$ ;NS	$F_{4,620}=51.05$ ;p< 0.0001
Droga X Consol	$F_{8,620}=2.24$ ;p< 0.05	$F_{8,620}=3.60$ ;p< 0.001	$F_{8,620}=2.47$ ;p< 0.05	$F_{8,620}=2.49$ ;p< 0.05
Droga X Bl 1 min.	$F_{16,620}=1.43$ ;NS	$F_{16,620}=1.16$ ;NS	$F_{16,620}=1.16$ ;NS	$F_{16,620}=0.73$ ;NS
Consol X Bl 1 min.	$F_{8,620}=0.70$ ;NS	$F_{8,620}=1.08$ ;NS	$F_{8,620}=0.59$ ;NS	$F_{8,620}=0.29$ ;NS
Droga X Consol X Bl 1 min.	$F_{32,620}=1.27$ ;NS	$F_{32,620}=1.09$ ;NS	$F_{32,620}=1.07$ ;NS	$F_{32,620}=0.64$ ;NS

Os ratos foram re-expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (segunda exposição). Estes animais receberam após a primeira exposição administração, via I.P., de diferentes droga em diferentes tempos; NS indica valor de  $F$  não significativo.

A figura 13 apresenta a %EA, a %TA, o número de EA e EF de ratos durante a 2ª exposição ao LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. Os animais foram previamente expostos ao LCE sem administração de drogas e, imediatamente após (Tempo de consolidação 0), receberam administração de diferentes drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. O teste de Duncan não indicou diferença na %EA (Fig. 13A), na %TA (Fig. 13B) e no número de EA (fig. 13C). Entretanto, o teste de Duncan revelou diminuição no número de EF (Fig. 13D) ao longo da exposição nos grupos tratados com salina (2º e 5º minuto; p< 0,05), escopolamina 1.0mg/kg (2º, 3º, 4º e 5º minuto; p< 0,05), agmatina 40mg/kg (2º, 3º, 4º e 5º minuto; p< 0,05), clonidina 0.2mg/kg (2º, 4º e 5º minuto; p< 0,05) e MK801 0.1mg/kg (2º e 4º minuto; p< 0,05). Não houve diferença entre os grupos tratados com droga e o grupo tratado com salina em nenhum dos minutos de exposição.

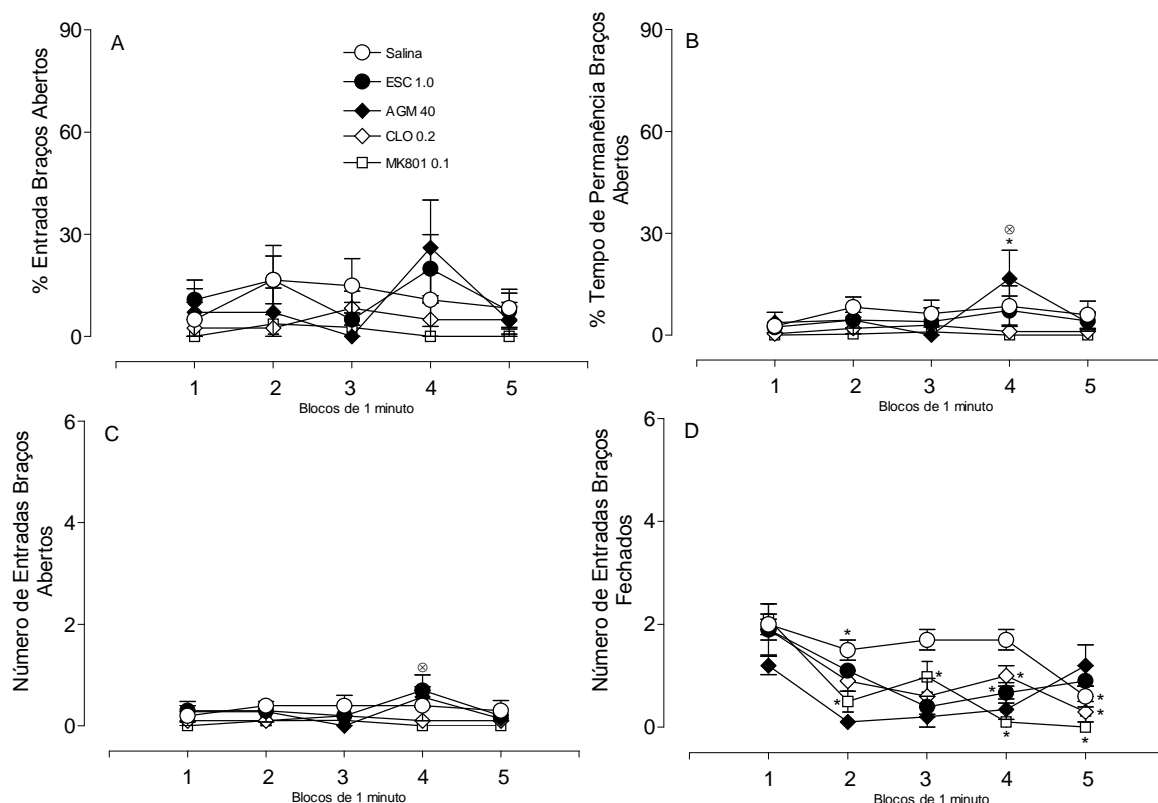


**Figura 13. Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 0.** Os animais foram expostos ao LCE (5 minutos) sem administração prévia de drogas (1ª exposição) e, imediatamente após (tempo de consolidação 0), receberam, por via i.p., administração de diferentes drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo 1º minuto.

A figura 14 apresenta a %EA, a %TA, o número de EA e EF de ratos durante a 2ª exposição ao LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. Os animais foram previamente expostos ao LCE sem administração de drogas e, 30 minutos após (Tempo de consolidação 30), receberam administração de diferentes drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. O teste de Duncan não revelou diferença na %EA (Fig. 14A) e no número de EA (Fig. 14C) ao longo da exposição em nenhum dos grupos experimentais, mas indicou aumento na %TA (Fig. 14B) no 4º minuto ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com agmatina 40mg/kg em relação ao primeiro minuto e em relação



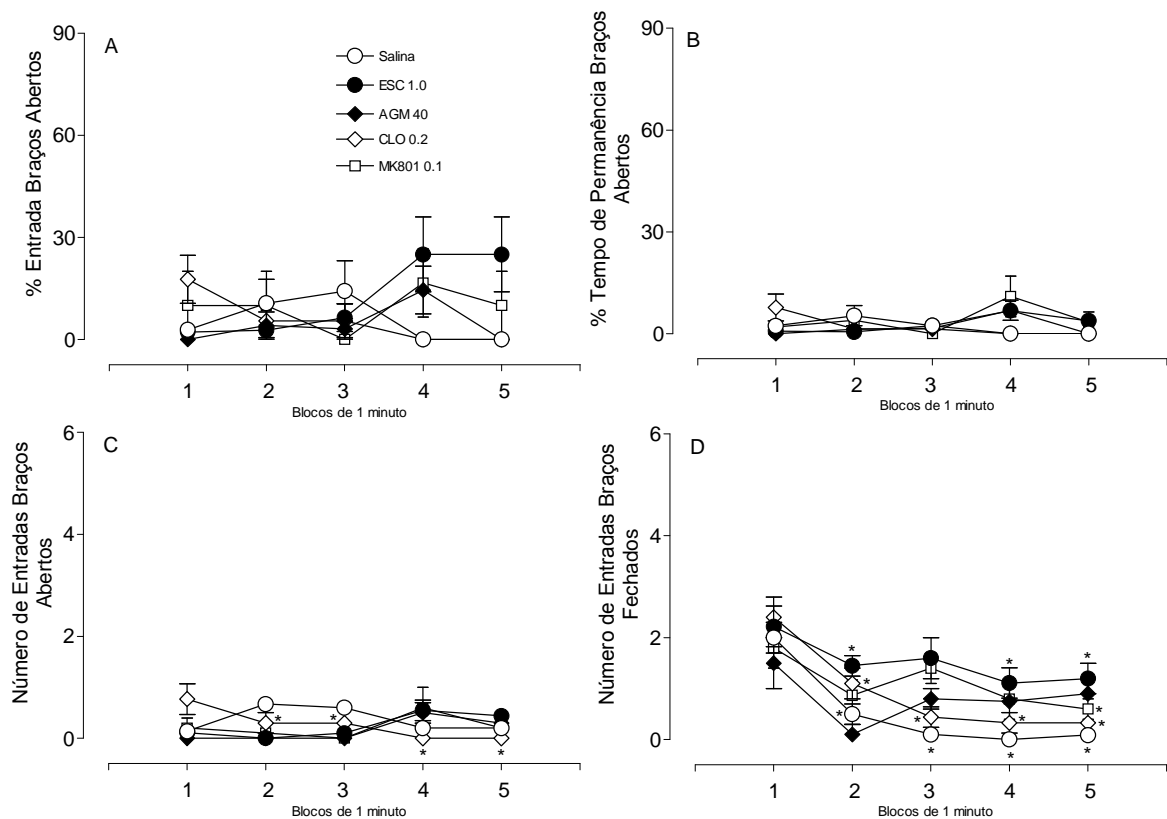
ao respectivo minuto no tempo de consolidação 0. O teste de Duncan indicou aumento no número de EA (Fig. 14C) no grupo tratado com escopolamina 1.0mg/kg (4° minuto;  $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo minuto no tempo de consolidação 0. O teste de Duncan também indicou diminuição no número de EF (Fig. 14D) ao longo da exposição nos grupos tratados com salina (2° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), escopolamina 1.0mg/kg (4° minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina 0.2mg/kg (4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e MK801 0.1mg/kg (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos tratados com droga e o grupo tratado com salina em nenhum dos minutos.



**Figura 14. Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 30.** Os animais foram expostos ao LCE (5 minutos) sem administração prévia de drogas e, 30 minutos após (tempo de consolidação 30), receberam, por via i.p., administração de diferentes drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo 1º minuto e  $\otimes P < 0,05$  em relação ao respectivo minuto no tempo de consolidação 0.

A figura 15 apresenta a %EA, a %TA, o número de EA e EF de ratos durante a 2ª exposição ao LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. Os animais foram previamente expostos ao LCE sem administração de drogas e, 180 minutos após (Tempo de consolidação 180), receberam administração de diferentes drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. O teste de Duncan não revelou diferença na %EA (Fig. 15A) e na %TA (Fig. 15B) no decorrer da exposição. Houve diminuição no número de EA (Fig. 15C) ao longo do tempo no grupo tratado com clonidina 0.2mg/Kg (2º, 3º, 4º e 5º minuto;  $p < 0,05$ ). O teste de Duncan também revelou diminuição no

número de EF (Fig. 15D) ao longo da exposição nos grupos tratados com salina (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), escopolamina 1.0mg/kg (2°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ), clonidina 0.2mg/kg (2°, 3°, 4° e 5° minuto;  $p < 0,05$ ) e MK801 0.1mg/kg (5° minuto;  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos tratados com droga e o grupo tratado com salina em nenhum dos minutos de exposição.



**Figura 15. Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Tempo de consolidação 180.** Os animais foram expostos ao LCE (5 minutos) sem administração prévia de drogas e, 180 minutos após (tempo de consolidação 180), receberam por via i.p., administração de diferentes drogas. Vinte e quatro horas após a primeira exposição os animais foram re-expostos ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo primeiro minuto.

### 4.3 EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL NO LCE:

#### 4.3.1 Resultados de evocação considerando-se o tempo total de exposição:

A tabela 5 apresenta o resultado geral da ANOVA durante a segunda exposição ao LCE, considerando-se o tempo total de exposição. Os animais foram submetidos à primeira exposição ao LCE sem tratamento com droga e vinte e quatro horas após, receberam administração de diferentes drogas previamente à segunda exposição (Evocação).

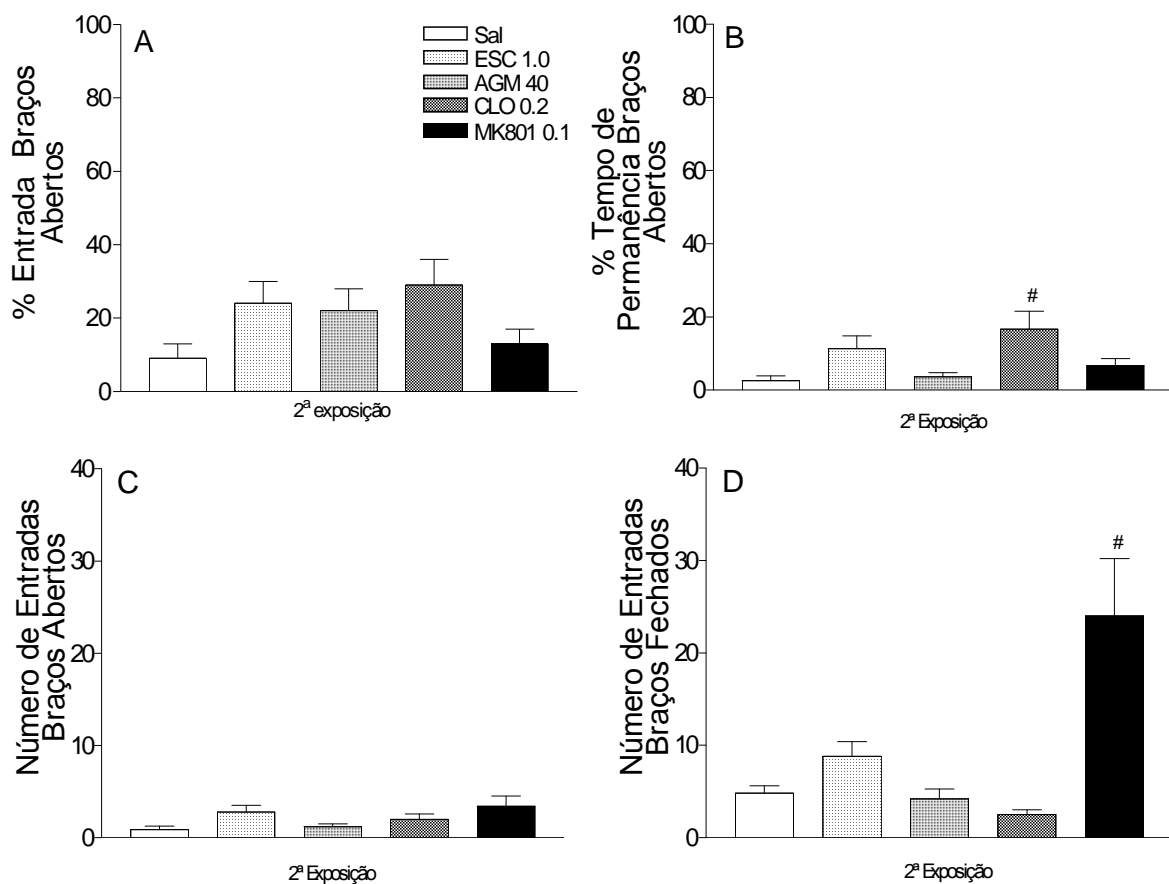
A figura 16 apresenta a %EA, a %TA, o número de EA e EF em ratos submetidos a 2ª exposição no LCE, considerando-se o tempo total de exposição. O teste de Duncan não indicou diferença entre os grupos na %EA (Fig. 16A) e no número de EA (Fig. 16C); entretanto, revelou maior %TA (Fig. 16B) no grupo tratado com clonidina (0.2mg/kg) e maior número de EF (Fig. 16D) no grupo tratado com MK801 (0.1mg/kg) em relação ao grupo tratado com salina ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5: Evocação de memória emocional no LCE**

Resultados da ANOVA de uma via da análise do tempo total (5 minutos)

Variáveis comportamentais	Droga
% entrada nos braços abertos	$F_{4,42} = 1.75$ ; NS
% tempo nos braços abertos	$F_{4,42} = 3.29$ ; $p < 0.05$
Entradas braços abertos	$F_{4,42} = 2.15$ ; NS
Entradas braços fechados	$F_{4,42} = 14.68$ ; $p < 0.0001$
Total de entradas	$F_{4,42} = 13.54$ ; $p < 0.0001$

Os ratos foram re-expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (segunda exposição) após administração prévia, via I.P., de diferentes drogas; NS indica não significativo.



**Figura 16. Porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Evocação.** Os animais foram expostos (5 minutos) ao LCE sem administração prévia de drogas (primeira exposição). Vinte e quatro horas após os animais foram re-expostos ao LCE, cada grupo recebeu administração, via i.p., de droga 30 minutos antes da segunda exposição ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, #  $P < 0,05$  em relação ao grupo salina.

### **4.3.2 Resultados de evocação considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto (análise temporal)**

A tabela 6 apresenta o resultado geral da ANOVA de duas vias para evocação de memória emocional em ratos no LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto.

**Tabela 6: Evocação de memória emocional no LCE**

Resultados da ANOVA de duas vias da análise minuto a minuto indicando os efeitos principais e interações

Variáveis comportamentais	Droga	Blocos de um minuto	Droga x Blocos de um minuto
% EA	$F_{4,210}=2.05$ ;NS	$F_{4,210}=0.28$ ;NS	$F_{16,210}=0.41$ ;NS
% TA	$F_{4,210}=5.35$ ;p< 0.001	$F_{4,210}=0.37$ ;NS	$F_{16,210}=0.93$ ;NS
EA	$F_{4,210}=3.69$ ;p< 0.05	$F_{4,210}=2.30$ ;NS	$F_{16,210}=1.27$ ;NS
EF	$F_{4,210}=47.82$ ;p<0.0001	$F_{4,210}=3.66$ ;p< 0.01	$F_{16,210}=2.26$ ;p< 0.01

Os ratos foram re-expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (segunda exposição) após administração prévia, via I.P., de diferentes drogas; NS indica não significativo.

A figura 17 apresenta a %EA, a %TA, o número de EA e EF de ratos durante a 2ª exposição ao LCE, considerando-se o tempo de exposição em blocos de 1 minuto. Os animais foram previamente expostos ao LCE sem administração de drogas e, vinte e quatro horas após, receberam administração de diferentes drogas 30 minutos antes de serem re-expostos ao LCE. O teste de Duncan não indicou diferença na %EA ao longo da exposição em nenhum dos grupos (Fig. 17A). Houve aumento na %TA (Fig. 17B) no 2º minuto, no grupo tratado com clonidina (0.2mg/kg), em relação ao grupo tratado com salina (p< 0,05). Também houve aumento no número de EA (Fig. 17C) no 1º minuto, no grupo tratado com escopolamina (1.0mg/kg) e no 3º minuto, no grupo tratado com MK801 (0.1mg/kg), quando comparados com o grupo salina nos respectivos minutos (p< 0,05).

O teste de Duncan também revelou diminuição no número de EF (Fig. 17D) ao longo da exposição no grupo tratado com escopolamina 1.0mg/kg ( 5º minuto; p< 0,05). No grupo tratado com MK801 (0.1 mg/kg), houve diminuição no número de EF no 3º minuto, e aumento, no 5º minuto, em relação ao 1º minuto (p< 0,05). O teste

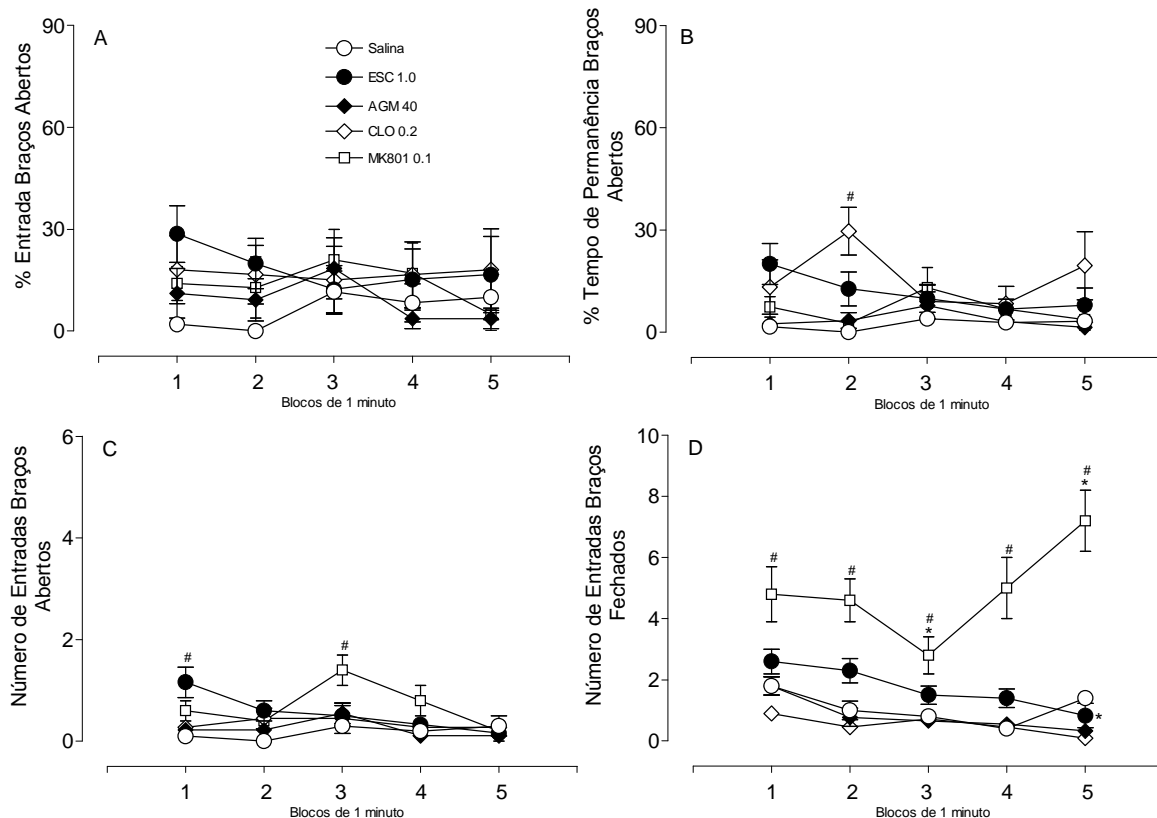
de Duncan indicou diminuição no número de EF no 4º, 5º, 6º, 7º, 8º e 9º minutos do

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

exposição, no grupo tratado com MK801 (0.1mg/kg), quando comparado com o grupo tratado com salina (Fig. 17D,  $p < 0,05$ ).



**Figura 17. Análise temporal da porcentagem de entrada (A), de tempo de permanência (B), número de entradas nos braços abertos (C) e número de entradas nos braços fechados (D) de ratos durante a segunda exposição ao LCE- Evocação.** Os animais foram expostos ao LCE (5 minutos) sem administração prévia de drogas e, vinte e quatro horas após, receberam administração prévia de droga, por via i.p., trinta minutos antes da segunda exposição ao LCE. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo primeiro minuto e #  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina, no respectivo minuto.

## 5 DISCUSSÃO

O LCE é muito utilizado no estudo da neuroanatomia, neurofisiologia e neuroquímica da ansiedade (RODGERS e COLE, 1994). Este labirinto, composto por espaços fechados e abertos, gera uma situação de conflito no animal caracterizado pela aproximação X esquiva (PELLOW et al., 1985).

O medo é utilizado na pesquisa da aprendizagem e memória (FENDT e FANSELOW, 1999) e a exposição do animal ao LCE é uma experiência geradora de medo (PELLOW et al., 1985), sendo assim a re-exposição do animal ao labirinto representa um modelo de aprendizagem e memória emocional em roedores. As possíveis áreas do SNC envolvidas na aprendizagem emocional no LCE seriam o hipocampo, estriado e amígdala.

A aprendizagem no LCE envolve memória espacial e memória emocional. A memória espacial está relacionada com a identificação dos diferentes ambientes do labirinto (braços abertos e fechados), enquanto a memória emocional esta relacionada com a identificação de áreas perigosas do labirinto, no caso os braços abertos, que geram medo no animal (DAL-CÓL et al., 2003).

O paradigma  $E_1/E_2$  baseia-se em expor o animal ao LCE por duas vezes consecutivas, possibilitando, assim, analisar a memória emocional adquirida na exposição prévia e evocada na exposição subsequente. Esta memória emocional, caracterizada pela esquiva dos braços abertos do LCE, é avaliada pelas variáveis %EA, %TA e número de EA, as quais estão inversamente relacionados com o nível de ansiedade. Esta ansiedade é fundamental na formação da memória emocional (MATHEWS, 1990).

O que se verifica na segunda exposição é um aumento significativo da esquiva dos braços abertos (TREIT et al., 1993), demonstrado pela diminuição das variáveis citadas, decorrente do medo aprendido na primeira exposição. Esta diminuição significativa das variáveis %EA, %TA e EA também ocorre ao longo dos cinco minutos da primeira exposição e é verificada através da análise temporal, demonstrando aquisição da esquiva no decorrer do tempo (minuto a minuto; RODGERS et al., 1996; ROSA et al., 2000; DAL-CÓL et al., 2003; PEREIRA et al., 2005). Sugere-se assim, que os animais expostos ao LCE adquiram, consolidam e



evocam memórias relacionadas ao medo, caracterizadas neste labirinto por aquisição, consolidação e evocação de esquivas dos braços abertos.

No presente estudo, verificamos o efeito do tratamento com drogas amnésicas nas fases de aquisição, consolidação e evocação da memória emocional de ratos no LCE, utilizando as seguintes drogas: escopolamina (antagonista de receptor muscarínico); clonidina (agonista de receptor  $\alpha$ -2 adrenérgico); agmatina (inibidor da enzima NOS) e MK801 (antagonista de receptor NMDA).

No experimento 1 o grupo tratado com salina demonstrou aumento da esquivas dos braços abertos na segunda exposição, quando comparada com a primeira exposição. A análise minuto a minuto também revelou diminuição na exploração dos braços abertos ao longo da primeira exposição, o que não ocorreu ao longo da segunda exposição. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois outros estudos já haviam demonstrado previamente que animais tratados com salina, quando re-expostos ao LCE, demonstram maior nível de medo, ou seja, maior esquivas dos braços abertos em relação à primeira exposição (PELLOW et al., 1985; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2000; PEREIRA et al., 2005). Outros estudos prévios também já haviam demonstrado aumento da esquivas em ratos (ROSA et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; BERTOGLIO et al., 2005) e camundongos (HOLMES e RODGERS, 1998) ao longo da primeira exposição. Desse modo, nossos resultados indicam que os animais tratados com salina 0,9% adquirem esquivas dos braços abertos quando expostos ao paradigma primeira/segunda exposição ao LCE.

Tradicionalmente, o número de EF é uma variável relacionada com a atividade locomotora dos animais no LCE (FILE, 1990). Considerando-se tanto o tempo total da exposição, quanto a análise minuto a minuto, os resultados demonstraram que o número de EF, nos animais que receberam administração de salina, é igual nas duas exposições, indicando assim ausência de adaptação locomotora. Porém, a análise temporal indicou diminuição ao longo da primeira e da segunda exposição no número de EF. Esse fato já havia sido demonstrado previamente em nosso laboratório (ROSA et al., 2000; PEREIRA et al., 2005). É possível que a motivação do animal em explorar o LCE diminua ao longo do tempo, à medida que eles adquirem informações a respeito do labirinto (PEREIRA et al., 2005).

Os resultados mostraram que a administração de ESC (0.5 e 1.0mg/kg) prejudica a aquisição de esquia no LCE. Das três variáveis comportamentais representativas de ansiedade, tais como %EA, %TA e número de EA, somente uma, no grupo tratado com ESC (0.5mg/kg), e duas, no grupo tratado com ESC (1.0mg/kg), tiveram redução significativa da primeira para a segunda exposição. No grupo tratado com ESC (0.5 mg/kg) não houve redução na %TA e na EA, enquanto que no grupo tratado com ESC (1.0mg/kg) não houve redução no número de EA entre as exposições ao LCE, o que sugere prejuízo da esquia dos braços abertos na segunda exposição. Já na análise temporal não houve diminuição na %EA e na EA nos animais tratados com ESC (1.0mg/kg) ao longo da primeira exposição; também não houve redução na %EA e na EA na segunda exposição, quando comparada com a primeira. Desse modo, considerando-se os resultados da análise total dos 5 minutos de exploração, bem como a análise minuto a minuto, sugere-se que os animais tratados com ESC (1.0mg/kg) exibem um prejuízo de aquisição de esquia mais evidente, em relação ao grupo tratado com ESC (0.5mg/kg).

Considerando-se o tempo total de exposição, o grupo tratado com ESC (4.0 mg/kg) previamente à primeira exposição exibiu o mesmo nível de %EA, %TA e EA na primeira e na segunda exposição ao LCE. Já na análise temporal, não houve diminuição na %EA e na %TA ao longo da primeira exposição. Sugere-se a partir destes resultados que os animais tratados com ESC na dose de 4,0mg/kg não adquirem a esquia dos braços abertos durante a primeira exposição e, na segunda exposição, apresentam o mesmo nível de ansiedade exibido na primeira. Portanto, os resultados indicam que o tratamento com ESC (4.0mg/kg) previamente à primeira exposição induz um efeito do tipo amnésico nos animais, sem prejuízo motor, visto que não houve alteração no número de EF.

Nossos resultados corroboram estudos prévios da literatura, indicando que o tratamento com ESC prejudica a aprendizagem e a memória em diferentes modelos animais, tais como o labirinto aquático (ROBINSON et al., 2004), labirinto em T elevado (TAKAHASHI et al., 2005), paradigma E1/E2 no LCE (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2004) e paradigma latência de transferência no LCE (DA CUNHA et al., 2005).

No paradigma latência de transferência no LCE, onde se analisa o tempo gasto pelo animal para transferir-se da extremidade de um braço aberto até um braço

à primeira exposição com ESC (1.0mg/kg; DA CUNHA et al., 2005), bem como camundongos tratados previamente com ESC (0.25 e 0.5mg/kg; HLINAK e KREJCI, 2002), exibiram prejuízo no aprendizado da latência de transferência. A administração prévia de ESC na dose de 1.0mg/kg também gerou déficit de aprendizagem em camundongos, durante a aquisição de esquiva inibitória no labirinto em T elevado (TAKAHASHI et al., 2005). Em experimentos utilizando o paradigma E1/E2 no LCE, o tratamento com ESC na dose de 1.5 mg/kg também induziu prejuízo na fase de aquisição da esquiva dos braços abertos no LCE (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2004); entretanto, Calzavara e colaboradores (2005) demonstraram que a administração de ESC na dose de 1.0 mg/kg não alterou a aquisição de esquiva em camundongos submetidos ao paradigma E1/E2 no LCE. Desse modo, embora existam resultados conflitantes, a maioria dos dados de literatura, bem como o presente estudo, apontam que a ativação dos receptores muscarínicos pode ser permissiva para a aprendizagem emocional no LCE.

Um aspecto importante nos estudos utilizando antagonistas muscarínicos em testes de aprendizagem e memória é o fato do córtex visual e retina dos animais exibirem receptores muscarínicos (NOBILI e SANNITA, 1997) e, o bloqueio desses receptores poderia afetar a discriminação visual dos animais. Nesse sentido, o efeito amnésico da droga, ou prejudicial sobre a aprendizagem, poderia ser atribuído a um efeito da mesma sobre o sistema visual do animal, e não sobre circuitos neurais envolvidos com a aprendizagem. De fato, um estudo realizado com ratos no labirinto aquático demonstrou que a administração sistêmica de ESC nas doses de 0.2 e 2.0mg/kg alterou a memória espacial dos animais, mas, enquanto a dose menor prejudicou somente a memória espacial, a dose maior também prejudicou a discriminação visual (ROBINSON et al., 2004). Desta forma, não podemos afirmar se o prejuízo de aquisição de esquiva, induzido pela administração de ESC (4.0 mg/kg), foi decorrente somente de prejuízo na memória emocional ou também de prejuízo da discriminação visual dos animais.

Com relação à consolidação e evocação da memória emocional no LCE, os grupos tratados com ESC na dose de 1.0mg/kg imediatamente, 30 e 180 minutos após a primeira exposição, não apresentaram, na segunda exposição, diferença em relação ao grupo controle, seja considerando-se a análise do tempo total, seja considerando-se a análise minuto a minuto. Esses dados indicam que o bloqueio

consolidação da esquia dos braços abertos no LCE. Com relação ao grupo tratado com ESC (1.0 mg/kg) previamente à segunda exposição, embora a análise do tempo total de exposição tenha indicado maior exploração dos braços abertos na segunda exposição, em relação ao grupo salina, a análise estatística não indicou uma diferença significativa; porém, na análise temporal, o grupo tratado com ESC (1.0 mg/kg) apresentou maior EA em relação ao grupo salina no primeiro minuto da segunda exposição, o que sugere que o bloqueio dos receptores muscarínicos previamente à segunda exposição possa ter prejudicado a evocação da memória emocional no LCE.

O principal mecanismo celular para a plasticidade neuronal é a LTP, que representa a base da aquisição de informações. A ligação entre sistema colinérgico hipocampal, LTP in vivo e aprendizado tem sido demonstrada, visto que agonistas de receptores muscarínicos aumentam LTP in vitro no hipocampo (BLITZER et al., 1990), facilitam a LTP in vivo e restauram o prejuízo de memória induzido por escopolamina em uma tarefa de esquia passiva (IGA et al., 1996).

Assim, o presente estudo, aliado a outros dados da literatura, sugere que a administração de ESC antes da primeira e segunda exposição ao LCE prejudicou, respectivamente, o processo de aquisição e evocação da esquia dos braços abertos no LCE, sugerindo que os receptores muscarínicos participam da aprendizagem da memória emocional no paradigma E1/E2 no LCE.

Os resultados da análise do tempo total e temporal demonstraram que o grupo tratado com AGM (20mg/kg) exibiu prejuízo da aquisição de esquia dos braços abertos no LCE. Na análise do tempo total o grupo tratado com AGM (20mg/kg) não apresentou redução da %TA e do número de EA entre as exposições ao LCE. Corroborando com esses dados, a análise temporal também não demonstrou redução da %EA e da %TA na segunda exposição, quando comparada com a primeira exposição. Já o grupo tratado com AGM (40mg/kg) adquiriu a esquia dos braços abertos no LCE, seja considerando-se o tempo total de exposição, seja considerando-se a análise temporal. Desse modo, os resultados indicam que apenas a administração de AGM na dose de 20mg/kg prejudicou a aquisição da esquia dos braços abertos, sem prejudicar a atividade locomotora dos animais durante a primeira exposição ao labirinto, sendo, portanto, ansiolítica em ratos no LCE.

A AGM é uma poliamina endógena que age como neurotransmissor ou

tegmental ventral e substância cinzenta periaquedutal, áreas relacionadas com a ansiedade e modulação da memória (GRAEFF et al., 1993; STEWART e McKAY, 2000). O presente estudo não permite afirmar o mecanismo de ação através do qual a AGM pode estar atuando para prejudicar a aquisição de esquiva no LCE, visto que a droga pode ligar-se aos receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos e imidazolínicos, bloquear receptores do tipo NMDA do glutamato (REIS e REGUNATHAN, 2000) e inibir a atividade catalítica de todas as isoformas de NOS (GALEA et al., 1996).

No encéfalo, a enzima NOS está localizada em regiões envolvidas com ansiedade, como o hipotálamo, amígdala e hipocampo (VINCENTE, 1994), indicando uma importante participação do NO, como um neuromodulador/neurotransmissor, na ansiedade. Entretanto, se a AGM estiver atuando mediante a inibição da NOS, então a síntese de NO pode ser ansiogênica em ratos. Partindo dessa premissa, nossos dados corroboram estudos prévios do nosso laboratório demonstrando prejuízo da esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 no LCE em ratos tratados com L-NAME (um inibidor da NOS) previamente a primeira exposição ao labirinto (PEREIRA et al., 2003). Da mesma forma, a administração sistêmica de L-NAME prejudicou a aquisição da esquiva inibitória em ratos no paradigma latência de transferência no LCE (DA CUNHA et al., 2005) e no labirinto em T elevado (CALIXTO et al., 2001). Além disso, a aprendizagem da esquiva inibitória tem sido associada ao aumento da atividade da NOS hipocampal em ratos; nesse sentido, a microinjeção de inibidores de NOS prejudicou (BERNABEU et al., 1995), enquanto a microinjeção de doadores de NO no hipocampo de ratos facilitou (FIN et al., 1995) a aprendizagem da esquiva inibitória no teste step-down.

Existem poucas publicações que relatam os efeitos da administração de AGM em ratos no LCE e esses estudos não utilizaram o paradigma E1/E2, nem a análise minuto a minuto para verificar a memória emocional, mas apenas uma única exposição ao LCE. Por exemplo, a administração sistêmica de AGM nas doses de 20 e 40mg/kg, mas não nas doses de 1, 10 e 100mg/kg induz um pequeno aumento no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, o que os autores interpretaram como efeito ansiolítico ameno. Entretanto, neste mesmo estudo, os animais tratados com AGM (100 mg/kg) exibiram diminuição do número de EF em relação ao grupo controle, sugerindo prejuízo da atividade locomotora (LAVINSKY et al., 2003). Em outro estudo a administração sistêmica de AGM (10, 20, 40, 80 e

indicando um efeito antidepressivo; além disso, o tratamento prévio com AGM nas doses de 40 e 80mg/kg previamente à exposição ao LCE induziu um efeito do tipo ansiolítico em ratos (ARICIOGLU e ALTUNBAS, 2003). O tratamento sistêmico com AGM (5 e 10mg/kg) também induziu amnésia, quando realizado previamente a uma tarefa de condicionamento de medo contextual (STEWART e MCKAY, 2000).

Em relação à consolidação da memória emocional no LCE, os grupos tratados com AGM (40 mg/kg) imediatamente, 30 e 180 minutos após a primeira exposição não apresentaram, na segunda exposição, diferença em relação ao grupo controle, seja considerando-se a análise do tempo total, seja considerando-se a análise minuto a minuto. Ainda que a análise temporal tenha demonstrado que o tratamento com AGM (40 mg/kg) 30 minutos após a primeira exposição induz aumento na %TA em relação ao tempo 0 e ao longo da segunda exposição, o presente estudo sugere que a administração de AGM (40mg/kg) não altera o mecanismo de consolidação da memória emocional de ratos no LCE. Ao contrário de nossos resultados, a injeção sistêmica de AGM (1, 10 e 20mg/kg) imediatamente após o treino de aquisição esquivia inibitória no teste de step down, facilitou a consolidação da memória emocional de ratos (ARTENI et al., 2002). Esse foi o único estudo encontrado em que a AGM, administrada sistemicamente, facilitou a memória relacionada ao medo. Acreditamos que essa discrepância entre os resultados pode estar relacionada às diferentes doses e/ou tipos de teste, os quais podem utilizar diferentes mecanismos e sistemas neuroquímicos na modulação da memória emocional. Com relação à evocação da memória emocional no LCE, o grupo tratado com AGM (40mg/kg) não apresentou, na segunda exposição, diferença quando comparado com o grupo controle. Resultado semelhante foi previamente obtido no teste de step down com AGM nas doses de 0.1, 1, 10 e 20mg/kg (ARTENI et al., 2002).

Assim o presente estudo sugere que a administração de AGM antes da primeira exposição ao LCE prejudicou, mas não bloqueou, o processo de aquisição da esquivas dos braços abertos no LCE. Este prejuízo na memória emocional de ratos submetidos ao LCE pode ser decorrente da inibição da NOS, do bloqueio de receptores do tipo NMDA ou ainda da ativação de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos pela AGM.

Os resultados da análise do tempo total de exposição, bem como a análise temporal, mostraram que a administração de CLO (0.05 e 0.1mg/kg) prejudica a



grupos tratados com CLO (0.05 e 0.1mg/kg) não demonstraram redução do número de EA entre as exposições ao LCE. Entretanto, a análise do tempo total, mas não a análise temporal, indica que animais tratados com CLO (0.05mg/kg) exibiram menor número de EF na primeira exposição, quando comparado com o grupo salina; o mesmo ocorreu quando os animais foram tratados com CLO na dose de 0.1mg/kg, embora a diferença não tenha atingido significância estatística. Desse modo, os resultados sugerem que o tratamento com CLO leva a um prejuízo locomotor nos animais, especialmente na dose de 0.05mg/kg. Portanto, o déficit de aquisição de esquiva dos braços abertos induzido pela CLO pode ser decorrente de uma inabilidade dos animais em explorar o labirinto e, conseqüentemente, não terem obtido informação suficiente a respeito do labirinto, prejudicando, assim, a aquisição da memória emocional. Por outro lado, verificou-se pela análise temporal que o tratamento com CLO (0.05mg/kg) induziu um efeito do tipo ansiolítico na primeira exposição ao LCE; esse grupo explorou mais os braços abertos na primeira exposição quando comparado com o grupo controle, sem alteração no número de EF. Esse dado da análise temporal corrobora um estudo prévio da literatura, demonstrando um efeito do tipo ansiolítico produzido pela administração de clonidina 0,01 mg/kg no LCE (JOHNSTON e FILE, 1989).

Já os prejuízos motor e de aquisição de esquiva, induzido pelo tratamento com CLO na dose de 0.2mg/kg, foram mais evidentes. O grupo tratado com CLO (0.2 mg/kg) previamente à primeira exposição demonstrou o mesmo nível em todas as variáveis relacionadas à ansiedade (%EA, %TA, EA) nas duas exposições ao LCE, além de maior %EA na segunda exposição, quando comparado com o grupo salina. Entretanto, em relação ao número de EF, o grupo tratado com CLO (0.2mg/kg) demonstrou menor atividade motora na primeira exposição, em relação ao grupo salina. Assim, o presente estudo sugere que o tratamento com CLO (0.2mg/kg) impediu a aquisição da esquiva dos braços abertos, mas este efeito pode ser decorrente da diminuição da atividade locomotora (sedação) na primeira exposição, que leva a diminuição da exploração do LCE e conseqüentemente inibe a aprendizagem da esquiva dos braços abertos. De fato, estudos prévios indicam que agonistas de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos podem produzir sedação e hipotensão (McDONALD et al., 1997).

O efeito amnésico da CLO tem sido previamente descrito na literatura. A

treino induziu amnésia, em camundongos no teste de esquiva passiva, o que não ocorreu quando a clonidina foi administrada 20 minutos antes ou imediatamente após a sessão treino (GALEOTTI et al., 2004b). Nossos resultados também sugerem que a CLO (0.1 mg/kg) prejudica a aquisição da esquiva em ratos, quando administrada 30 minutos antes da primeira exposição. Tem sido proposto que a ativação de receptores do tipo  $\alpha$ -2 adrenérgicos prejudica a memória porque esses receptores estão acoplados às proteínas Gi (inibitória), as quais inibem a atividade da adenil-ciclase, diminuindo assim os níveis de AMPc intracelular e, conseqüentemente, prejudicando a memória (GALEOTTI et al., 2004a). Esses receptores são encontrados no lócus coeruleus, hipocampo, amígdala, hipotálamo e córtex cerebral (McCUNE et al., 1993).

Com relação à consolidação da memória emocional no LCE, os animais tratados com CLO (0.2mg/kg) administrada imediatamente e 180 minutos após a primeira exposição não apresentaram, na segunda exposição, diferença em relação ao grupo controle, seja considerando-se a análise do tempo total, seja considerando-se a análise temporal. Por outro lado, quando o tratamento com CLO (0.2mg/kg) foi feito 30 minutos após a primeira exposição, foi observado que os animais exibiram aumento do nível de ansiedade na segunda exposição, quando comparado com o grupo tratado com salina. Acreditamos que esse efeito pode ser atribuído a uma elevação da linha de base comportamental do grupo salina, quando comparado com os outros tempos de consolidação empregados no presente estudo, especialmente o tempo 0. Desse modo, o presente estudo sugere que a ativação dos receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos, após a primeira exposição ao LCE, não altera a consolidação da esquiva dos braços abertos.

Com relação à evocação da memória emocional no LCE, o grupo tratado com CLO (0.2mg/kg) previamente à segunda exposição, apresentou na análise do tempo total e também na análise minuto a minuto maior exploração dos braços abertos (%TA) em relação ao grupo salina, sugerindo que a ativação dos receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos, antes da segunda exposição possa ser ansiolítica devido, não a uma alteração na atividade locomotora dos animais, mas sim a um prejuízo na evocação da memória emocional no LCE.

Desta forma, o presente estudo, juntamente com pesquisas prévias, sugere que a administração de CLO antes da primeira e segunda exposição ao LCE



prejudicou, respectivamente, o processo de aquisição e evocação da esquia dos braços abertos no LCE, sugerindo que os receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos participam da aprendizagem de memória emocional no paradigma E1/E2 no LCE.

Os resultados, tanto do tempo total de exposição quanto da análise temporal, indicam que a administração de um antagonista NMDA (MK801) induz um efeito do tipo ansiolítico durante a primeira exposição ao LCE, sem alteração da atividade locomotora dos animais. Nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que a administração de antagonistas NMDA na amígdala basolateral (MISERANDINO et al, 1990) e na região dorsolateral da PAG (MOLCHANOV e GUIMARÃES, 2002), mas não no núcleo hipotalâmico dorsomedial (JARDIM e GUIMARÃES, 2004), resultou em redução da ansiedade em ratos, sugerindo assim o envolvimento do glutamato, abundante na amígdala e outras estruturas límbicas e corticais, na modulação da ansiedade (HLINAK e KREJCÍ, 2002).

Apesar do efeito ansiolítico induzido na primeira exposição ao LCE, os grupos tratados com MK801 (0.075 e 0.1mg/kg), adquiriram a esquia dos braços abertos no LCE. Estudos prévios da literatura já haviam demonstrado este efeito do tipo ansiolítico em ratos tratados previamente a primeira exposição com MK801(0.06mg/kg), sem prejuízo da aquisição da esquia dos braços abertos na segunda exposição no paradigma E1/E2 do LCE (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2003). Esses dados sugerem que o bloqueio dos receptores do tipo NMDA do glutamato não alterou a aquisição da memória emocional no LCE.

Por outro lado, em outro modelo de avaliação de memória emocional no LCE, o paradigma latência de transferência, a administração sistêmica de MK801 nas doses de 0.15mg/kg (DA CUNHA et al., 2005; HLINAK e KREJCÍ, 2002) e 0.4mg/kg (HLINAK e KREJCÍ, 2002), antes da primeira exposição, prejudicou a memória emocional em ratos. Assim, acreditamos que o fato da administração de um antagonista NMDA prejudicar a memória emocional no paradigma da latência de transferência, mas não no paradigma E1/E2 no LCE, possa ser atribuído simplesmente a uma questão de dose. No presente estudo, uma dose maior de MK801 (0.15mg/kg) foi utilizada, mas houve um alto índice de queda de animais do LCE, o que inviabilizou a utilização de uma dose maior (dados não mostrados).

Com relação à consolidação da memória emocional no LCE, os tratamentos com MK801 (0.1mg/kg), imediatamente e 180 minutos após a primeira exposição,

análise do tempo total, seja considerando-se a análise temporal. Porém, o grupo tratado com MK801 30 minutos após a primeira exposição apresentou menor %TA na segunda exposição, em relação ao grupo controle. Acreditamos que esse efeito pode ser atribuído a uma elevação da linha de base comportamental do grupo salina, quando comparado aos outros tempos de consolidação empregados no presente estudo, especialmente o tempo 0. Desse modo, o presente estudo sugere que os animais tratados com MK801 (0.1mg/kg), imediatamente, 30 e 180 minutos após a primeira exposição, consolidaram a esquia dos braços abertos no LCE.

No paradigma latência de transferência, no LCE, camundongos tratados com MK801 (0.075mg/kg), imediatamente e 30 minutos após a primeira exposição, também não apresentaram alteração na consolidação da memória, já os animais tratados com MK801 (0.15, 0.25 e 0.4mg/kg) demonstraram um prolongamento da latência de transferência, na segunda exposição, indicando prejuízo na consolidação da memória emocional no LCE (HLINAK e KREJCÍ, 2002). Estes dados sugerem, novamente, que o prejuízo na consolidação da memória emocional no LCE, causado por MK801, é dependente da dose. Na tarefa de esquia inibitória no teste de Step-Down, a administração de AP5 (outro antagonista do receptor NMDA) na região CA1 do hipocampo, imediatamente após o treino, prejudicou a memória emocional dos animais, sugerindo que os receptores NMDA no hipocampo participam da fase precoce da consolidação da memória (CAMMAROTA et al., 2000).

Com relação à evocação da memória emocional no LCE, o grupo tratado previamente à segunda exposição com MK801 (0.1mg/kg) apresentou, na análise temporal, maior exploração dos braços abertos (número de EA) em relação ao grupo salina, indicando um efeito do tipo ansiolítico. Entretanto, este aumento da exploração dos braços abertos pode ter sido decorrente de um aumento da atividade locomotora induzido pela droga nesses animais, já que houve aumento do número de EF em relação ao grupo controle, o que indica uma significativa estimulação locomotora. Sugere-se assim, que ratos tratados com MK801 (0.1mg/kg) antes da segunda exposição, demonstraram aumento da exploração dos braços abertos, não por prejuízo na evocação da memória emocional no LCE, mas devido à alteração na atividade locomotora dos animais.

Em estudo realizado por Bertoglio e Carobrez (2003), no paradigma E1/E2 do LCE, ratos tratados com MK801 (0.03 e 0.06mg/kg), previamente à segunda

braços abertos. Esses autores sugerem que a experiência prévia ao LCE, poderia induzir mudanças funcionais no receptor NMDA, ficando insensível ao MK801 na re-exposição ao LCE.

Já no paradigma latência de transferência, no LCE, camundongos tratados com MK801 nas doses de 0.15, 0.25 e 0.4mg/kg, mas não na dose de 0.075mg/kg, exibiram prejuízo na evocação da memória emocional no LCE (HLINAK e KREJČÍ, 2002). Novamente o prejuízo de memória (evocação) foi dose dependente.

Assim, o presente estudo, não demonstrou prejuízo da memória emocional no paradigma E1/E2, decorrente da administração sistêmica de MK801. Entretanto os dados da literatura demonstram que doses maiores de MK801 (antagonista de receptores NMDA) prejudicam a memória emocional no LCE e sugerem que os receptores NMDA estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória emocional e espacial no LCE. Utilizamos doses maiores de MK801 (0.15mg/kg), (dados não mostrados) em nosso estudo, porém esta dose causou alto índice de queda dos animais do LCE, decorrente do aumento da atividade locomotora e hiperatividade.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, onde utilizamos o paradigma E1/E2 do LCE, cuja exploração induz aquisição, consolidação e evocação da esquia dos braços abertos, demonstrou-se que animais tratados com ESC, AGM e CLO apresentaram prejuízo da memória emocional no LCE. Desse modo, o presente estudo sugere que receptores muscarínicos, síntese de NO e receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos estão envolvidos na aprendizagem emocional de ratos no LCE.

## 6 CONCLUSÕES

1. Ratos tratados com ESC (0.5 e 1.0mg/kg), antes da primeira exposição, exibiram prejuízo, enquanto que ratos tratados com ESC (4.0mg/kg) exibiram bloqueio de aquisição de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 do LCE.
2. Ratos tratados com ESC (1.0mg/kg), antes da segunda exposição, exibiram prejuízo da evocação de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 do LCE.
3. Ratos tratados com AGM (20mg/kg), antes da primeira exposição, exibiram prejuízo da aquisição de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 do LCE.
4. Ratos tratados com CLO (0.05 e 0.1mg/kg), antes da primeira exposição, exibiram prejuízo da aquisição de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 do LCE, com prejuízo da atividade locomotora CLO (0.05mg/kg).
5. Ratos tratados com CLO (0.2mg/kg), antes da primeira exposição, exibiram bloqueio da aquisição de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 do LCE, com diminuição da atividade locomotora na primeira exposição.
6. Ratos tratados com CLO (0.2mg/kg), antes da segunda exposição, exibiram prejuízo da evocação de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 do LCE.
7. Ratos tratados com MK801 (0.075 e 0.1mg/kg), antes da primeira exposição, exibiram aumento da exploração dos braços abertos (efeito ansiolítico) na primeira exposição ao LCE.

8. Ratos tratados com MK801 (0.1mg/kg), antes da segunda exposição, exibiram aumento da exploração dos braços abertos e dos braços fechados no LCE, sugerindo aumento da atividade locomotora.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T.; LATTAL, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11: 180-187, 2001.

ARICIOGLU, F.; ALTUNBAS, H.; Is agmatine an endogenous anxiolytic antidepressant agent? *Annals of the New York Academy of sciences*, 1009: 136-140, 2003.

ARTENI, N. S.; LAVINSKY, D.; RODRIGUES, A. L.; FRISON, V. B.; NETTO, C. A. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78: 465- 469, 2002.

BAILEY, C. H.; GIUSTETTO, M.; HUANG, Y.; HAWKINS, R. D.; KANDEL, E.R. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory? *Nature Reviews*, 1: 11- 20, 2000.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BERGINK, V.; MEGEN, H. J. G.M.; WESTENBERG, H. G. M. Glutamate and anxiety. *European Neuro-Psychopharmacology*, 14: 175- 183, 2004.

BERNABEU R.; DE STEIN, M. I.; FIN, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *NeuroReport*, 6: 1498- 1500, 1995.

BERTOGLIO, L. J.; ANZINI, C.; LINO-de- OLIVEIRA, C.; CAROBREZ, A. P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Behavioural Brain Research*, 162: 99- 107, 2005.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A.P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharmacology*, 170: 335-342, 2003.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A.P. Escopolamine given pré-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. *Behavioural Pharmacology*, 15: 45-54, 2004.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arm avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108: 197- 203, 2000.

BLITZER, R. D.; GIL, O.; LANDAU, E. M. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 119: 207-210, 1990.

CALIXTO, A. V.; VANDRESEN, N.; DE NUCCI, G.; MORENO, H. JR.; FARIA, M. S. Nitric Oxide may underlie learned fear in the elevated T- maze. *Brain Research Bulletin*, 55: 37-42, 2001.

CALZAVARA, M. B.; PATTI, C. L.; LOPEZ G.B.; ABÍLIO, V. C.; SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sciences*. 76: 2235- 2246, 2005.

CAMMAROTA, M.; STEIN, M. L.; PARATCHA, G.; BEVILAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, H. Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 25: 567- 572, 2000.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 122: 169- 174, 2001.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, J.L. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, 29: 1193-1205, 2005.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, 25, 697- 709, 2001.

CRUZ- MORALES, S.E.; SANTOS, N.R.; BRANDÃO, M.L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic- sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72: 973-978, 2002.

DA CUNHA, I. C.; JOSÉ, R. F.; ORLANDI PEREIRA, L.; PIMENTA J. A.; OLIVEIRA DE SOUZA, I. A.; REISER, R.; MORENO JÚNIOR, H.; I. C.; NETO, J. M.; PASCHOALINI, M.A.; FARIA, M.S. The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus- maze. *Physiology & Behavior*, 84: 351- 358, 2005.

DAL-CÓL, M.L.C.; PEREIRA, I. O.; ROSA, V.P.; CALIXTO, A.V.; CAROBREZ, A.P.; FARIA, M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 74: 395–400, 2003.

DASH, P.K.; HEBERT, A. E.; RUNYAN, J.D. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Research Reviews*, 45: 30-37, 2004.

DUNCAN, C.P. in: MCGAUGH, J. L. Memory- a Century of Consolidation. *Sciences Compass*, 287: 248-251, 2000.

FARIA, M. S.; MUSCARÁ, M. N.; MORENO, H.; TEIXEIRA, S. A.; DIAS, H. B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F. G.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *European Journal of Pharmacology*, 323: 37- 43, 1997.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!



FEND, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 743-760; 1999.

FILE, S.E. One- trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, 100:281-2, 1990.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19: 394- 405, 1998.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 21: 312-320, 1999.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. “ One trial tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 110: 240-244, 1993.

FIN, C.; DA CUNHA, C.; BROMBERG, E.; SCHIMITZ, P. K.; BIANCHIN, M.; MEDINA, J. H. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory process. *Neurobiology of Learning Memory*, 63: 113-115, 1995.

GALEA, E.; REGUNATHAN S.; ELIOPOULOS, V.; REIS DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *The Biochemical Journal*, 316: 247-249, 1996.

GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C.  $\alpha$ -2 agonists induce amnesia through activation of the Gi- Protein signalling pathway. *Neuroscience*, 126: 451-460, 2004.

GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Alpha-2 agonist-induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptor subtype. *Behavioural Brain Research*, 153 (2): 409-417, 2004.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80: 194- 210, 2003.

GRAEFF, F. G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, G.; BURROWS, G.D.; NOYES, R. (Eds). *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 1990. vol. 3 (pp. 307-57).

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 811-829, 1994.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, 58: 123-131, 1993.

GRAY, J.A. The neuropsychological basis of anxiety. In: G.C. Last & m. Hersen (Edts), *Handbook of anxiety disorder*. New York: Pergamon, 1988.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of  $\alpha_2$ - adrenoceptor agonist and antagonist in a maze exploration model of fear- motivated behaviour. *N. S. Arch. Pharmacol*, 327: 1-5, 1984.

HLINAK, Z.; KREJCI, I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behavioural Brain Research*, 131: 221- 225, 2002.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 21-30, 1996.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Responses of swiss-webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 60: 473-488, 1998.

HU, Y.; XIA, Z.; SUN, Q.; ORSI, A.; REES, D. A new approach to the pharmacological regulation of memory: Sarsasapogenin improves memory by elevation the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models. *Brain Research*, 1060: 26- 39, 2005.

IGA, Y., ARISAWA, H., ISE, M., YASUDA, H., AND TAKESHITA, Y. Modulation of rhythmical slow activity, long-term potentiation and memory by muscarinic receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, 308: 13- 19, 1996.

JARDIM, M.C.; GUIMARÃES, F.S. Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 79: 541- 546, 2004.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Yohimbine's anxiogenic action: evidence for noradrenergic and dopaminergic sites. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* , 32(1):151-156,1989.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. *Princípios da Neurociência*. 4ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

LAVINSKY, D.; ARTENI, N. S.; NETTO, C. A. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 141: 19- 24, 2003.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46: 321-340, 1990.

LYNCH, M.A. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, 84:87-136, 2004.

McCUNE, S. K.; VOIGT, M. M.; HILL, J. M. Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience*, 57: 143-151, 1993.

MACDONALD E.; KOBILKA, B. K.; SCHEININ, M. Gene targeting-homing in on  $\alpha$ 2-adrenoceptor- subtype function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18: 211- 219, 1997.

McGAUGH, J. L. Memory- a Century of Consolidation. *Sciences Compass*, 287: 248-251, 2000.

McGAUGH, J. L.; MELNTYRE, C. K.; POWER, A. E. Amygdala Modulation of Memory Consolidation: Interaction with Other Brain Systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78: 539- 552, 2002.

MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behaviour Research and Therapy*, 28: 455- 568, 1990.

MISERANDINO, M. J. D.; SANANES, C. B.; MELIA, K. R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear- potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 345: 716- 718, 1990.

MOLCHANOV, M.L.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology*, 160:30–38, 2002.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48: 254- 260, 1955.

NOBILI, L.; SANNITA, W. G. Cholinergic modulation, visual function and Alzheimer's dementia. *Vision Research*, 37: 3559-3571, 1997.

OTTONI, E.B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32: 446-449, 2000.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth*, 14: 149-167, 1985.

PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learning & Memory*, 11: 21- 27, 2004.

PEREIRA, O. L. Aquisição do comportamento de esquiva no labirinto em cruz elevado: efeito de um inibidor da síntese de óxido nítrico. Florianópolis, 2003. 91p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.

PEREIRA, O. L.; CUNHA, I. C.; NETO, J. M.; PASCHOALINI, M.A.; FARIA, M.S. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behavioural Brain Research*, 159: 55-61, 2005.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*. 64: 51- 68, 2001.

RAGOZZINO, M. E.; DETRICK, S.; KESNER, R. P. Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *The Journal of Neuroscience*, 19: 4585- 4594, 1999.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in Pharmacological Sciences*, 21: 187- 193, 2000.

RICHTER-LEVIN, G.; AKIRAV, I. Emotional tagging of memory formation – in the search for neural mechanisms. *Brain Research Reviews*, 43: 247- 256, 2003.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140: 1- 47, 2003.

ROBINSON, L.; HARBARAN, D.; RIEDEL, G. Visual acuity in the water maze: sensitivity to muscarinic receptor blockade in rats and mice. *Behavioral Brain Research*, 151: 277- 286, 2004.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 289- 304, 1997.

RODGERS, R. J.; COLE, J.C. The elevated plus- maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDRIE, C. A., (Eds.). *Ethology and Psychopharmacology*. Chichester: John Wiley and Sons, 1994.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; COLE, J.C.; DEWAR, C.V.; KIDD, G.R.; KIMPSON, P.H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of Trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54:41 –50, 1996.

ROSA, V. P.; VANDRESEN, N.; CALIXTO, A. V.; KOVALESKI, D. F.; FARIA, M. S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 67: 177- 182, 2000.

SILVEIRA, M.C.; SANDNER, G., GRAEFF, F.G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 56: 115-118, 1993.

SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G.; PRESS, G.A. Magnetic resonance imaging of the hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. *The Journal of Neuroscience*, 10: 3106–3117, 1990.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E.R. *Memória: Da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed, 2003.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

STEWART, L. S.; McKAY, B. E. Acquisition deficit and time- dependent retrograde amnesia for contextual fear conditioning in agmatine- treated rats. *Behavioural Pharmacology*, 11: 93- 97, 2000.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F.A.; FERNANDES, M. S. The cannabinoid antagonist SR 141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T maze. *Neuroscience Letters*, 380: 270- 275, 2005.

THOMPSON, J.J. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 24: 13438- 13444, 1996.

TREIT, D.; MENARD, J.;ROYAN,C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44: 463-469, 1993.

VINCENT, S. R. Nitric oxide: A radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 42: 129- 160, 1994.